

**Charakterisierung von RNA-Polymerase-Mutanten und von
Transkriptionsfaktoren mit Hilfe des genetischen Systems von
*Pyrococcus furiosus***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Ingrid Waege
aus Landshut

im Jahr 2014

**Charakterisierung von RNA-Polymerase-Mutanten und von
Transkriptionsfaktoren mit Hilfe des genetischen Systems von
*Pyrococcus furiosus***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Ingrid Waege
aus Landshut

im Jahr 2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 14.01.2014

Diese Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Winfried Hausner

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeine Einleitung	1
1.1. <i>Pyrococcus furiosus</i>	1
1.2. Strategien für die genetische Manipulationen bei Archaeen	2
1.3. Zuckermetabolismus in <i>P. furiosus</i>	10
1.4. Transkription bei Archaeen und Eukaryoten	13
1.5. RNA-Polymerasen	17
1.6. Motivation	19
2. Die Struktur-Funktions-Analyse bei RpoA⁷-Mutanten	21
2.1. Einleitung	21
2.1.1. Etablierung des Shuttle-Vektor-Systems, der Transformations- und Selektionsstrategie	21
2.1.2. RpoA ⁷ und die RNA-Polymerisation	24
2.1.3. Zielsetzung	26
2.2. Materialien und Methoden	27
2.2.1. Bakterien- und Archaeenstämmen	27
2.2.2. Verwendete Plasmide	28
2.2.3. pYS7 und dessen Derivate pYS7 H87P und pYS7 ΔTip	28
2.2.4. Electrophoretic mobility shift assay	30
2.2.5. Kaliumpermanganat-Footprinting	30
2.2.6. DNase-Footprinting	33
2.2.7. Rohextrakte für Proteom-Analyse	34
2.3. Ergebnisse	35
2.3.1. Reinigung und Quantifizierung der RNAP-Varianten	35
2.3.2. Funktionsanalyse der modifizierten RpoA ⁷ -RNAPs	38
2.3.3. Analyse der <i>P. furiosus</i> -Stämme	40
2.3.4. PF0739	43
2.4. Diskussion	48
3. Charakterisierung von TrmBL2	53
3.1. Einleitung	53
3.1.1. Regulation der Transkription bei Archaeen	53
3.1.2. Der Transkriptionsregulator TrmB	54
3.1.3. Regulatoren der TrmB-Familie in <i>P. furiosus</i>	56

3.1.4. Zielsetzung	58
3.2. Material und Methoden	58
3.2.1. Bakterien- und Archaeenstämme	59
3.2.2. Erzeugte Plasmide	59
3.2.3. DNA-Manipulationen und Plasmid-Konstruktionen	59
3.2.4. RNA-Expressionsanalyse	61
3.2.5. Chip-seq	66
3.3. Ergebnisse	69
3.3.1. Etablierung der TrmBL2 modifizierten <i>P. furiosus</i> Stämme MURPf6 und MUR-Pf10	69
3.3.2. <i>In vivo</i> Charakterisierung von TrmBL2	72
3.3.3. <i>In vitro</i> Funktionsanalyse von TrmBL2	77
3.3.4. Hitzestabilität von TrmBL2	81
3.4. Diskussion	84
4. Gerichtete Evolution einer chimären Rpb5/RpoH-Untereinheit	89
4.1. Einleitung	89
4.1.1. RpoH und Rpb5	89
4.1.2. Zielsetzung	94
4.2. Materialien und Methoden	94
4.2.1. Bakterien- und Archaeenstämme	94
4.2.2. DNA-Manipulationen und Plasmid-Konstruktionen	95
4.3. Ergebnisse	98
4.3.1. Etablierung der <i>P. furiosus</i> RpoH-Mutanten	98
4.3.2. MURPf38 und MURPf39	98
4.3.3. pMUR43 und pMUR54	98
4.3.4. Vitalität der <i>P. furiosus</i> RpoH-Mutanten	99
4.3.5. Aktivität der modifizierten RNAP	101
4.4. Diskussion	102
5. Optimierung des Chitinstoffwechsels	105
5.1. Einleitung	105
5.1.1. Chitin und Chitinasen	105
5.1.2. Die markerlose Selektions-Strategie	107
5.2. Material und Methoden	109
5.2.1. Bakterien- und Archaeenstämme	109
5.2.2. Erzeugte Plasmide	109
5.2.3. Chemikalien	110
5.2.4. Kultivierung von <i>P. furiosus</i> und <i>T. kodakarensis</i>	110
5.2.5. Durchführung der Selektions- und Gegenselektionsstrategie	112
5.2.6. DNA-Manipulationen und Plasmid-Konstruktionen	113

5.3. Ergebnisse	119
5.3.1. <i>P. furiosus</i> MLΔPF1950 (MURPf27)	119
5.3.2. Modifikationen der Chitinase-Einheiten	122
5.3.3. Untersuchungen des Chitin-Abbaus	125
5.4. Diskussion	128
6. Allgemeine Diskussion	131
6.1. Erfahrungsberichte - Grenzen und Möglichkeiten der genetischen Hilfsmittel	132
6.1.1. Der Expressionsvektor	132
6.1.2. Die Simvastatin Selektion	135
6.1.3. Das markerlose Simvastatin-XGPRT-System	137
6.2. Ausblick	141
7. Zusammenfassung	143
8. Summary	145
Anhang	i
1. Standard-Methoden und Materialien	i
1.1. Molekularbiologische Methoden	i
1.2. Proteinbiochemische Verfahren	viii
1.3. Organismische Methoden	xii
1.4. Chemikalien	xvi
1.5. Enzyme, Standards, Kits	xviii
2. Abkürzungen	xviii
2.1. Allgemeine Abkürzungen	xviii
2.2. Buchstabencode der Aminosäuren	xxii
Abbildungsverzeichnis	xxiii
Tabellenverzeichnis	xxvii
Publikationen	xxix
Erklärung	xxxi
Danksagung	xxxiii

1. Allgemeine Einleitung

1.1. *Pyrococcus furiosus*

1986 wurde *Pyrococcus furiosus* durch Fiala und Stetter aus heißen, marinen Sedimenten auf der Insel Vulcano (Italien) isoliert [Fiala und Stetter, 1986]. *P. furiosus* (lat. 'rasender Feuerball') gehört zur Gruppe der Archaea, welche neben Bacteria und Eukarya die dritte Domäne des Lebens bilden [Woese, 1990]. Die Einteilung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse erfolgte anhand der Analyse von 16S bzw. 18S ribosomaler RNA (rRNA). Die Archaeen werden mit den Bacteria zu den Prokaryoten gezählt. Jedoch weisen diese grundlegende Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu beiden Domänen, Eukarya und Bacteria, auf und stellen somit ein Bindeglied zwischen diesen Domänen dar [Keeling und Doolittle, 1995]. Vor allem die Morphologie der Einzeller, ihr einzelnes ringförmiges Chromosom, das Fehlen der Kernhülle, sowie die Genstruktur existieren in Übereinstimmungen mit den Bacteria [Facciotti *et al.*, 2007]. Im Bereich der Prozessierung der genetischen Information in DNA-Replikation [Kelman und White, 2005], Transkription [Grünberg *et al.*, 2007], RNA-Metabolismus [Hartung und Hopfner, 2009] und Translation [Bell und Jackson, 1998] ähnelt der zelluläre Apparat der Archaeen mehr einer vereinfachten Version der Eukaryoten. Zudem weisen die Archaeen einige einzigartige Besonderheiten im Bezug auf den Stoffwechsel oder die Zusammensetzung der Zellmembran auf [Siebers und Schönheit, 2005, Koga und Morii, 2007].

Viele Archaeen zeichnen sich durch ihre Anpassung an extreme Habitate hinsichtlich Salzkonzentration, Temperaturbedingungen, Säuregehalt oder Druck aus. Mittlerweile ist bekannt, dass die Archaeen ebenso in gemäßigten Biotopen auftreten und ihr Vorkommen nicht nur auf extreme Lebensräume beschränkt ist [DeLong, 1998]. Die Unterteilung der Archaea erfolgt in vier Untergruppen: (I) Euryarchaeota, (II) Crenarchaeota, (III) Korarchaeota sowie (IV) Nanoarchaeota. *P. furiosus*, ein Vertreter der *Thermococcales*, gehört zu den hyperthermophilen Euryarchaeota und ist optimal an ein Leben bei Temperaturen von über 80 °C adaptiert. Folglich sind dessen Zellkomponenten thermostabil und die Aktivität der Proteine auf hohe Temperaturbereiche angepasst [Stetter, 1999]. Umweltstudien deuten darauf hin, dass die *Thermococcales* in den hydrothermalen Kaminsystemen der Tiefsee ubiquitär sind [Orphan *et al.*, 2000]. Mit einem Wachstumsoptimum von 100 °C ist *P. furiosus* unter obligat anaeroben Bedingungen in der Lage, heterotroph Polysaccharide, Pyruvat oder Pepton sowie weitere komplexe organische Substrate saccharolytisch oder proteolytisch als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen [Fiala und Stetter, 1986, Schäfer und Schönheit, 1993]. Die Assimilation ist an die Reduktion von Schwefel bzw. dem Elektronen-Transfer auf Schwefelverbindungen gekoppelt [Amend und Shock, 2001]. Unter optimalen Wachstumsbedingungen können die stark (monopolar-polytrich) begeißelten und hoch beweglichen Kokken (Ø 0,8-2,5 µm)

Generationszeiten von lediglich 37 Minuten erreichen. Das zirka 1,9 Mbp umfassende Genom von *P. furiosus* ist bereits vollständig sequenziert. Zurzeit sind 2192 annotierte, putative offene Leserasster im Genom nachgewiesen [Poole *et al.*, 2005].

1.2. Strategien für die genetische Manipulationen bei Archaeen

Strategien und Verfahren zur Modifikation von Genen eines Organismus gehören heute zu den gängigen Verfahren bei der Charakterisierung von Genen. Für die Identifizierung von Genen, deren resultierende Proteine an einem spezifischen Stoffwechselweg beteiligt sind, wurden in der Vergangenheit klassische genetische Strategien verfolgt, bei denen zufallsbedingte Mutagenesen durchgeführt und in den mutierten Stämmen nach komplementierenden Genen gesucht wurden ('forward genetics'). Im Gegensatz dazu werden heute meist Strategien zur zielgerichteten Modifikation von Genen ('reverse genetics') angewendet [Leigh *et al.*, 2011, Kohler und Metcalf, 2012]. Führt die Deletion bzw. Unterbrechung oder auch Überexpression eines Gens zu einem phänotypisch veränderten Wachstum des Organismus, können so Rückschlüsse auf die physiologische Funktion der Genprodukte, Proteine oder RNAs, gezogen werden. Zusätzlich können beim 'genetic engineering' auch neue oder zusätzliche biologische Funktionen in einen Organismus eingeführt werden oder aber Stoffwechselwege unterbrochen werden [Kreuzer *et al.*, 2013]. Jedoch wären gezielte Veränderungen von Genen ohne Kenntnisse über Transformationsmethoden, Selektionsmarker, Vektoren und Systeme für ortsspezifische Rekombinationen nicht möglich [Leigh *et al.*, 2011]. Auch die steigende Anzahl an sequenzierten Genomen bei Mikroorganismen hat erheblich zur Erweiterung der genetischen Hilfsmittel beigetragen. Verglichen mit Eukaryoten oder Bacteria ist die Verfügbarkeit von genetischen Systemen bei Archaeen aber noch überschaubar [Leigh *et al.*, 2011, Atomi *et al.*, 2012]. Es hat sich gezeigt, dass viele Archaeen gegen konventionelle Antibiotika, die bei bakteriellen Systemen zur Selektion verwendet werden resistent sind, da Zielstrukturen der Antibiotikawirkung (etwa Peptidoglykan) in Archaeen nicht vorhanden sind. Jedoch gibt es Ausnahmen und damit auch Antibiotika die für die Selektion bei Archaeen genutzt werden können [Hilpert *et al.*, 1981]. Zusätzlich führen die zum Teil extremophilen Wachstumsbedingungen mancher Archaeen im Hinblick auf Selektions- und Screeningmethoden zu höheren Ansprüchen. Diese Faktoren haben zu einer Verzögerung der Entwicklung von Strategien zur genetischen Manipulation bei Archaeen im Vergleich zu den Bacteria geführt, welche nun langsam ausgeglichen wird. Innerhalb der Crenarchaeota existieren für viele *Sulfolobus* Arten mittlerweile genetische Hilfsmittel. Und auch bei den Euryarchaeota wurden genetische Systeme für eine Anzahl von Halophilen, Methanogene und Angehörige der *Thermococcales* entwickelt. In Tabelle 1.1 sind vorhandene Techniken bei verschiedenen Gattungen der Archaeen, welche in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden zusammengefasst.

Tabelle 1.1.: Überblick der etablierten Selektionsstrategien zur genetischen Manipulation bei Archaeen. Modifiziert nach [Atomi *et al.*, 2012]. (H = Halophile; M = Methanogene; S = *Sulfolobus*; T = *Thermococcales*; 6-AU = 6-Azauracil, 8-ADP = 8-Aza-2,6-Diaminopurin)

	Markergen	Merkmale des Wirtes	Eigenschaften des Mediums	H	M	S	T
Selektionskriterium							
Novobiocin-Resistenz	<i>gyrB</i> Mutante	-	-	o	-	-	-
Mevinolin/Simvastatin-Resistenz	<i>hmgcr</i> Überexpression	-	-	o	-	o	o
Puromycin-Resistenz	<i>pac</i>	-	-	-	o	-	-
Neomycin-Resistenz	APH3 I/II	-	-	-	o	-	-
Hygromycin B-Resistenz	thermostabile <i>hph</i> Mutante	-	-	-	-	o	-
Butanol/Benzylalkohol-Resistenz	<i>adh</i>	-	-	-	-	o	o
Uracil-Prototrophie	<i>pyrE</i> , <i>pyrF</i>	<i>pyrE</i> ⁻ , <i>pyrF</i> ⁻ , <i>upp</i> ⁺	Pyrimidin-frei	o	-	o	o
Leucin-Prototrophie	<i>leuB</i>	<i>leuB</i> ⁻	Leucin-frei	o	-	-	-
Tryptophan-Prototrophie	<i>trpE</i> , <i>trpAB</i>	<i>trpE</i> ⁻ , <i>trpAB</i> ⁻ , <i>upp</i> ⁺	Tryptophan-frei	o	-	-	o
Histidin-Prototrophie	<i>hisA</i>	<i>HisA</i> ⁻	Histidin-frei	-	o	-	-
Lactose-Prototrophie	<i>lacS</i>	<i>lacS</i> ⁻	Kohlenstoffquelle Lactose	-	-	o	-
Agmatin-Prototrophie	<i>pdaD</i>	<i>pdaD</i> ⁻	(mit Hefeextrakt/ Trypton)	-	-	-	o
Gegenselektionskriterium							
5'-FOA Resistenz	<i>pyrE</i> , <i>pyrF</i>	<i>pyrE</i> ⁻ , <i>pyrF</i> ⁻	-	o	-	o	o
6-AU/8-ADP/8-Azahypoxanthin-Resistenz	<i>hprt</i>	resistentes <i>hprt</i>	-	-	o	-	-
6-Methylpurin-Resistenz	<i>hprt</i>	resistentes <i>hprt</i>	-	-	-	-	o

Halophile

Bei halophilen Archaeen wurde als erstes die Transformation mit Fremd-DNA als standardisierte Prozedur etabliert. Die frühe Entwicklung genetischer Systeme spiegelt sich in der Vielzahl an verfügbaren genetischen Tools wider (vgl. Tabelle 1.1). Die mesophile und aerobe Lebensweise dieser Organismen erleichterte im Vergleich zu anderen Archaeentypen deren Entstehung [Charlebois, 1987, Cline und Doolittle, 1987]. Genetische Systeme, die sowohl auf der Verwendung von Antibiotika-Resistenz-Kassetten als auch Auxotrophie-Selektionsmarker basieren, wurden innerhalb der Halophilen vor allem bei *Halobacterium (Hb.) salinarum* und *Haloferax (Hf.) volcanii* ausge-

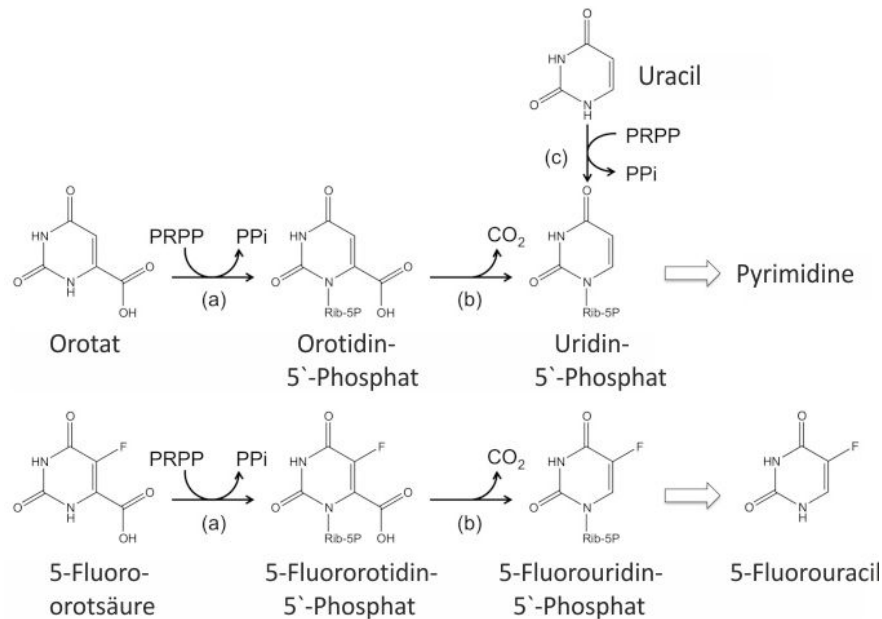


Abbildung 1.1.: **Auszüge der Uracil *de novo* Synthese der *Thermococcales*.** Schematische Darstellung der Reaktionen die durch (a) das *pyrE* Genprodukt (Orotat-Phosphoribosyltransferase), (b) dem *pyrF* Genprodukt (Orotidin-5'-Monophosphat Decarboxylase) und (c) dem *upp* Genprodukt (Uracil-Phosphoribosyltransferase) katalysiert werden. Auch die Umwandlung von 5-Fluororotsäure (5-FOA) in Fluorouridin-5'-Phosphat und 5-Fluorouracil (5-FU) sind angegeben. Abbildung nach [Atomi *et al.*, 2012].

baut [Atomi *et al.*, 2012]. Als Antibiotikum werden zum einen Novobiocin, ein Hemmer der DNA-Gyrase (*gyrB*), als auch Mevinolin bzw. Simvastatin, ein Inhibitor der 3 Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase, erfolgreich verwendet [Holmes und Dyall-Smith, 1991, Lam und Doolittle, 1992]. Gene, die eine Novobiocin resistente DNA-Gyrase kodieren bzw. die durch Überproduktion der HMG-CoA-Reduktase (HMGCR) Resistenz gegen Mevinolin/Simvastatin vermitteln, wurden genutzt, um *E. coli*-*Hf. volcanii* Shuttle-Vektoren zu generieren [Holmes *et al.*, 1994, Blasieo, 1990]. Einen umfassenden Überblick bzgl. der mannigfaltig existierenden Strategien und Anwendungen bei Halophilen geben Allers und Mevarech [Allers und Mevarech, 2005] und Soppa [Soppa, 2011].

Seit einigen Jahrzehnten werden Auxotrophie-Marker dem Gebrauch von Antibiotikaselektionsmarker aufgrund unerwünschter homologer Rekombinationen mit chromosomalen Genen präferiert [Leigh *et al.*, 2011]. Es werden Gene, die in der Aminosäure- oder Nukleotidbiosynthese involviert sind, eingesetzt, um endogene Defizite zu komplementieren [Atomi *et al.*, 2012]. Das *ura3* (oder *pyrF*) Gen kodiert für die Orotidin-5'-Monophosphat (OMP) Decarboxylase, einem Enzym der Uracil bzw. Pyrimidin *de novo* Synthese. Zellen mit einem Defekt im *pyrF* Gen sind Uracil prototroph, können jedoch proliferieren, wenn dem Medium Uracil zugesetzt wird. Dies ermöglicht die Verwendung des *ura3/pyrF* Systems auch zur Gegenselektion, da bei Zugabe von 5-Fluororotsäure (5'-FOA), wie in Abbildung 1.1 dargestellt, in Zellen mit intaktem *ura3/pyrF* Gen die toxischen Verbindungen 5-Fluorouridin-5'-Phosphat und 5-Fluorouracil (5-FU) gebildet werden, was das Wachstum dieser Zellen inhibiert [Boeke *et al.*, 1987]. Die in den Zellen aus 5'-FOA entstehenden Verbindungen stören die DNA- bzw. RNA-Synthese durch Hemmung des Enzyms

der Thymidinsynthese. Somit können gezielt Zellen mit defektem *pyrF* (oder *pyrE*) Gen selektiert werden, indem dem Medium 5'-FOA und eine Pyrimidin-Vorstufe wie etwa Uracil zugesetzt wird. Das erste Gendeletionssystem mit Gegenselektionsmarker basierte auf dem *ura3* von *Hb. salinarum* [Peck *et al.*, 2000]. Mittlerweile ist der *ura3* Selektionsmarker auch für weitere halophile Arten etabliert und die Anwendung der Methodik optimiert [Wang *et al.*, 2004]. Zudem konnte das System auch genutzt werden um weitere Auxotrophie-Selektionsmarker, etwa *ura5* (*pyrE*), dem Gen der Orotat-Phosphoribosyltransferase [Bitan-Banin *et al.*, 2003], zu etablieren. In *Hf. volcanii* werden zudem *leuB* und *trpA* verwendet um Leucin- bzw. Tryptophanprototrophie zur Selektion nutzen zu können [Allers *et al.*, 2004]. Der *hdrB* Marker kann als Komponente der Thymidinbiosynthese gut für Shuttle-Vektoren verwendet werden, weil dieser auch die Selektion auf nährstoffreichem Medium ermöglicht [Allers *et al.*, 2004].

Auch das System zur Expression von Genen wurde für *Hf. volcanii* weiterentwickelt. Hier findet der Promotor der Tryptophanase (*tnaA*) Anwendung, der bei Abwesenheit von Tryptophan reprimiert und bei Zugabe von mehr als 1 mM Tryptophan effektiv induziert wird und so die konditionelle Überexpression von Genen ermöglicht [Allers *et al.*, 2010]. Vor kurzem wurde zudem für *Hb. salinarum* ein System zur graduell induzierbaren Genexpression etabliert [Kixmüller und Greie, 2012]. Dieses basiert auf dem Promotor des Operons für das Kalium-Transportsystem (*kdp*), welcher in direkter Abhängigkeit zur Konzentration von Kaliumionen im Medium reguliert wird. Zuletzt stehen auch verschiedene Reporter-gen-Systeme zur Verfügung. Durch die beiden kolorimetrischen Reportergene der β -Galactosidase *bgaH* aus *Hf. alicantei* und einem halophilen Derivat von GFP (green fluorescent protein) kann die Genexpression bei Haloarchaea untersucht werden [Reuter und Maupin-Furlow, 2004]. *bgaH* und *dhfr* werden bevorzugt auch als Reporter für Transkriptionsanalysen verwendet [Danner und Soppa, 1996].

Methanogene

Innerhalb der Methanogenen wurden für Arten der Gattungen *Methanococcus* und *Methanosarcina* genetische Systeme entwickelt [Bertani und Baresi, 1987, Kohler und Metcalf, 2012]. Die relevantesten Techniken basieren auf der Verwendung von Antibiotika und deren Resistenzmarker zur Selektion, etwa Puromycin und dem Gen der Puromycin-Transacetylase (*pac*) aus *Streptomyces alboniger* [Weidenbach *et al.*, 2008, Atomi *et al.*, 2012] (vgl. Tab. 1.1). Bei *M. maripaludis* wurde eine gewisse Sensitivität gegenüber Neomycin bzw. Geneticin festgestellt, die es ermöglicht, das Gen der Aminoglykosid-Phosphotransferase (APH) als Selektionsmarker zu verwenden [Argyle *et al.*, 1996]. Auch die Transformationseffizienz konnte mittels Polyethylenglykol (PEG) optimiert werden [Tumbula *et al.*, 1994].

Weiterhin sind Systeme die auf einer Histidin-Auxotrophie bzw. -Prototrophie und der Verwendung des *hisA* Gens als Selektionsmarker [Pfeiffer *et al.*, 1998, Atomi *et al.*, 2012] beruhen ebenso etabliert wie Gegenselektionssysteme [Moore und Leigh, 2005] (vgl. Tab. 1.1). Markerlose genetische Systeme, welche zur Selektion das Gen der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (*hprt*) und zur Gegenselektion eine 8-Aza-2,6-Diaminopurin (8-ADP) Resistenz einbeziehen sind für *M. acetivorans* und *M. barkeri* verfügbar [Welander und Metcalf, 2008, Buan *et al.*, 2011]. Bei dieser

Strategie, häufig als 'Pop-in/Pop-out'-Verfahren bezeichnet, werden generell die Konstrukte zur Veränderung von Genen so aufgebaut, dass der Selektionsmarker durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder aus dem Genom entfernt wird und so für anschließende genetische Manipulationen erneut verwendet werden kann [Leigh *et al.*, 2011]. Nach der Transformation werden durch positive Selektion Mutanten erhalten, die durch homologe Rekombination das gesamte Konstrukt integriert haben. Mit der Gegenselektion werden Zellen angereichert, welche ein zweites Rekombinationsereignis vollziehen. Dies führt entweder zur Entfernung des gesamten Vektors, was den Wildtyp erzeugt, oder verursacht die Entfernung der Marker, wodurch die gewünschte Mutante entsteht.

Zur Genexpression stehen bei einigen Methanogenen auch induzierbare bzw. regulierbare Promotorsequenzen zur Verfügung [Atomi *et al.*, 2012], wie etwa der *nif* Promotor (Stickstofffixierung), der eine differentiell kontrollierbare Expression ermöglicht [Lie *et al.*, 2005]. Für *Methanosarcina* ist auch ein Tetrazyklin induzierbarer Promotor mit Bindestellen für bakterielles Tetrazyklin zur Genexpression konstruiert worden [Guss *et al.*, 2008]. Für Reportergen-Analysen werden zumeist *uidA* (kodiert für die β -Glucuronidase) bei *Methanosarcina* [Pritchett *et al.*, 2004] und *uidA* sowie *lacZ* (kodiert für die β -Galactosidase) bei *Methanococcus* [Lie und Leigh, 2002] verwendet. Trotz der Sauerstoffempfindlichkeit der Organismen ist es möglich bei kurzer Sauerstoffexposition eine Farbentwicklung zur Sortierung der Kolonien zu nutzen und dennoch lebende Zellen zu erhalten. Auch ein *in vivo* Transposon-Mutagenese-System wurde entwickelt, bei dem ein Transposon-Element, das ursprünglich aus Insekten stammt, eingesetzt wird. Das Element enthält einen *E. coli* Replikationsursprung und integriert mit hoher Frequenz an beliebigen Stellen im Genom [Zhang *et al.*, 2000].

Sulfolobales

Bereits sehr früh konnten bei den Sulfolobales, den einzigen genetisch veränderbaren Vertretern der Crenarchaeota [Leigh *et al.*, 2011], natürlich vorhandene genetische Elemente genutzt werden. Diese beinhalten Viren der Sulfolobales, kryptische Plasmide und Transposons [Zillig *et al.*, 1996, Prangishvili *et al.*, 1998]. Viele der ursprünglichen Transformationssysteme basieren auf diesen nativen Elementen [Atomi *et al.*, 2012]. Später wurden Selektionsmarker zur genetischen Manipulation hinzugezogen [Aagaard *et al.*, 1996, Berkner und Lipps, 2008].

Eine durch die Alkohol-Dehydrogenase aus *S. solfataricus* vermittelte Resistenz gegen Butanol oder Benzylalkohol [Aravalli und Garrett, 1997] ist zur Selektion ebenso gebräuchlich wie der Einsatz einer thermostabilen Hygromycin-Phosphotransferase aus *E. coli* zur Vermittlung der Resistenz gegen Hygromycin B [Cannio *et al.*, 1998]. Für *S. islandicus* wurde kürzlich ein weiteres Gendelektionssystem, basierend auf der durch die Überexpression der HMG-CoA-Reduktase erzeugten Resistenz der Zellen gegen Simvastatin beschrieben [Zhang und Whitaker, 2012]. Ein Stamm mit einer Deletion im *lacS* Gen, welches für eine β -Galactosidase kodiert, existiert für *S. solfataricus*. Die Verwendung eines intakten *lacS* als Markergen ermöglicht dabei eine Selektion der Transformanten mit laktosehaltigem Minimalmedium. Zusätzlich können *lacS*⁺ Kolonien anschließend durch Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden [Schelert *et al.*, 2003, Atomi *et al.*, 2012]. Die Gendelektio-

nen bzw. -unterbrechungen wurden bei *S. solfataricus* früher durch Einzel-Crossover-Ereignisse unter Verwendung von Plasmid-DNA erzeugt, später auch durch Zweifach-Crossover, wobei linearisierte Plasmid-DNA oder PCR-Produkte verwendet werden können [Albers und Driessen, 2008].

Bei *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* und *S. islandicus* sind Wirtsstämme mit defekten *pyrE* und/oder *pyrF* Genen etabliert [Deng *et al.*, 2009, Wagner *et al.*, 2009, Atomi *et al.*, 2012]. Unter Verwendung der genannten Selektionssysteme wurden viele *E. coli*-*Sulfolobus* Shuttle-Vektoren für Promotorstudien oder für die homologe oder heterologe Expression von Fusionsproteinen erzeugt [Stedman *et al.*, 1999, Jonuscheit *et al.*, 2003, Auccelli *et al.*, 2006]. Bei *S. acidocaldarius* ist eine Reihe kleiner multicopy Shuttle-Vektoren konstruiert worden, die zur Expression von Genen genutzt werden können. Hierbei besteht sowohl die Möglichkeit der konstitutiven Genexpression, etwa durch Verwendung des *sac7d* Promotors, oder der induzierbaren Genexpression, z.B. durch Verwendung des *mal* Promotors, der durch Maltose- oder Dextrinzugabe stark induziert wird [Berkner und Lipps, 2008]. Auch der *Sulfolobus*-Turreted-Icosahedral-Virus (STIV) kann heute genetisch modifiziert werden [Wirth *et al.*, 2011, Maaty *et al.*, 2012]. Ein infektiöser Klon des STIV wurde erzeugt und Deletionen einzelner Gene und deren Auswirkung auf die virale Replikation analysiert.

Thermococcales

In der Ordnung *Thermococcales* stand zu Beginn dieser Arbeit neben einem Shuttle-Vektor-System für *Pyrococcus abyssi* [Lucas *et al.*, 2002] das bei Weitem größte Spektrum an genetischen Manipulationshilfen für *Thermococcus kodakarensis* zur Verfügung (vgl. Tab. 1.1). Wie beschrieben, war auch bei *T. kodakarensis* ein Wirtsstamm mit defizienten *pyrF* und/oder *pyrE* Gen eine Grundvoraussetzung um Deletionen von Genen erstellen zu können [Hileman und Santangelo, 2012, Atomi *et al.*, 2012]. Die Selektion konnte durch Integration des entsprechenden Markergens in einem Medium, das sowohl Uracil als auch 5'-FOA enthält, erfolgen. Durch Zweifach-Crossover wurde später *pyrF* aus dem Wildtypstamm KOD1 entfernt und so der $\Delta pyrF$ Stamm KU216 erzeugt. Dadurch konnte des Weiteren der *pyrF* Marker zur Unterbrechung des *trpE* Gens genutzt werden, wodurch der Stamm KW128 ($\Delta pyrF$, $\Delta trpE < pyrF$) generiert wurde. Bei den Stämmen KU216 und KW128 können demnach für genetische Manipulationen *pyrF* und *trpE* als Markergene verwendet werden [Sato *et al.*, 2003, Sato *et al.*, 2005].

Für die 'Pop-in/Pop-out' Strategie wurden Plasmide erstellt, auf denen sich neben dem gegenselectionierbaren *pyrF* Gen noch zwei zum Chromosom homologe Bereiche befanden. Nach der Transformation in $\Delta pyrF$ Zellen wurde das Plasmid über Einfach-Crossover an einem der beiden homologen Bereiche ins Chromosom aufgenommen (vgl. Abb. 1.2). Durch die Inkubation in Pyrimidin-freiem bzw. -armen Medium erhalten jene Zellen, welche das Plasmid mit dem *pyrE* Gen ins Genom integrieren gegenüber den nicht transformierten Zellen einen Selektionsvorteil, und reichern sich an. Durch die Überführung in Medium, welches sowohl Uracil als auch 5'-FOA enthält, können nur diejenigen Zellen proliferieren, welche in einem zweiten Rekombinationsereignis das Plasmid mit der *pyrF* Sequenz wieder aus dem Genom entfernt haben. Findet diese zweite Rekombination im Vergleich zum ersten Ereignis im identischen Bereich statt, ent-

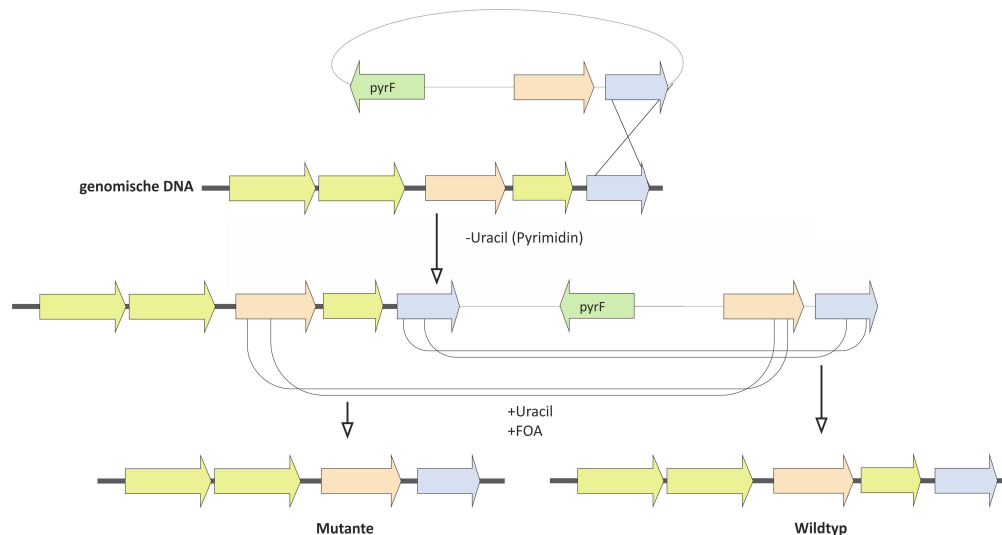


Abbildung 1.2.: Schematischer Überblick der single Crossing-over Strategie zur markerlosen Deletion von Genen. Selektion und Gegenselektion finden über *pyrF* statt.

steht genotypisch der Wirtstamm. Findet diese im zweiten homologen Bereich statt, entsteht der gewünschte modifizierte Stamm ohne Markergen [Sato *et al.*, 2005]. Eine weitere Gegenselektionsstrategie basiert auf dem Gen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*hgpRT*, TK0664) [Hileman und Santangelo, 2012]. Wird das Gen der HGPRT integriert, bewirkt dies eine Sensitivität der Zellen gegenüber 6-Methylpurin (6-MP). Durch die Deletion des Gens hingegen werden die Zellen resistent gegenüber 6-MP. Die Gegenselektion ist mit dieser Methodik auch in komplexen Medien möglich [Santangelo *et al.*, 2010]. Eine Erweiterung des Systems nutzt Wirtszellen mit einer Agmatin-Auxotrophie, welche auf eine Deletion des Gens der Arginin-Decarboxylase (*pdaD*) zurückzuführen ist. Dieses Enzym wandelt Arginin in Agmatin um, eine entscheidende Vorstufe für die Polyamin-Biosynthese. Selbst in komplexen Medien können Zellen mit unterbrochenem (*pdaD*) Gen nur mit Zusatz von Agmatin wachsen [Fukuda *et al.*, 2008, Santangelo *et al.*, 2010].

Tabelle 1.2.: Genetische Werkzeuge für *Thermococcales*. Modifiziert nach [Leigh *et al.*, 2011].

	<i>T. kodakarensis</i>	<i>P. abyssi</i>	<i>P. furiosus</i>
Definiertes Medium	Ja [Sato <i>et al.</i> , 2003]	Ja [Lucas <i>et al.</i> , 2002]	Ja [Blumentals <i>et al.</i> , 1990]
DNA-Bereitstellung	Transformation [Sato <i>et al.</i> , 2003]	PEG-vermittelte Transformation [Lucas <i>et al.</i> , 2002]	Transformation [Waage <i>et al.</i> , 2010]
Restriktionsbarriere	Nein	Nein	Nein
Replikativer Shuttle-Vektor	pLC70 [Santangelo <i>et al.</i> , 2008b]	pYS2 [Lucas <i>et al.</i> , 2002]	pYS3 [Waage <i>et al.</i> , 2010]
Positive Selektion	Simvastatin [Matsumi <i>et al.</i> , 2007]	-	Simvastatin [Waage <i>et al.</i> , 2010]
Agmatin	Deletion der	-	-
Auxotrophie	Arginin-Decarboxylase [Fukuda <i>et al.</i> , 2008]		
Gegenselektion (auch bei markerloser Gendeletion oder Substitution)	5-FOA <i>pyrF</i> [Sato <i>et al.</i> , 2005] [Takemasa <i>et al.</i> , 2011]; 6-Methylpurin (TK0664) [Santangelo <i>et al.</i> , 2010]	-	<i>P. furiosus</i> COM (<i>pyrF</i>) [Lipscomb <i>et al.</i> , 2011] [Farkas <i>et al.</i> , 2011]
Reportergene	TK1761 (β -Galactosidase) [Santangelo <i>et al.</i> , 2008a]	-	-
Regulierte Genexpression	<i>fbp</i> (TK2164) Promotor [Hirata <i>et al.</i> , 2008a]	-	PF1399 Promotor [Chandrayan <i>et al.</i> , 2012]; <i>cipA</i> (PF0190) Promotor [Basen <i>et al.</i> , 2012]
Protein Überexpression	<i>gdh</i> (TK1431) und <i>csg</i> (TK0895) Promotoren [Mueller <i>et al.</i> , 2009] [Takemasa <i>et al.</i> , 2011]	-	<i>gdh</i> (PF1602) [Waage <i>et al.</i> , 2010]

Bei *T. kodakarensis* wurden mittlerweile eine Vielzahl von Gendeletionsanalysen durchgeführt, welche dazu beitragen konnten, die physiologische Funktion der Gene im Bezug auf Metabolismus, DNA-Replikation oder Transkription bzw. deren Regulation zu untersuchen [Atomi *et al.*, 2012]. Die Deletion von Transkriptionsfaktoren mit anschließender Transkriptomanalyse hat die Identifizierung von Regulons und deren Regulatoren forciert [Kanai *et al.*, 2010]. Aber auch viele Gene, die an Stoffwechselwegen, wie etwa der Glykolyse [Imanaka *et al.*, 2006, Matsubara *et al.*, 2011], der Gluconeogenese [Sato *et al.*, 2004] oder dem Pentose-Metabolismus [Orita *et al.*, 2006] beteiligt sind, wurden analysiert. Weiterhin wurde ein System der Simvastatin-Resistenz entwickelt [Matsumi *et al.*, 2007], welches auf der Überexpression der HMGCR basiert. Da das Wachstum von *T. kodakarensis* durch Simvastatin inhibiert werden kann, wurden Kassetten mit dem *hmgcr* Gen (endogen *hmgcr_{TK}* und heterolog *hmgcr_{PF}*) unter Kontrolle des Promotors des Glutamatdehydrogenase-Gens (*gdh*) aus *T. kodakarensis* erstellt. Generell wird die Expression der heterologen Genvariante bevorzugt, da unerwünschte Rekombinationsereignisse des Markergens mit dem Chromosom reduziert werden [Leigh *et al.*, 2011]. Die Methodik erlaubt die Selektion der Transformanten selbst

in nährstoffreichem Medium und konnte auch auf andere *Thermococcus* Arten übertragen werden [Kim *et al.*, 2010].

Auch Shuttle-Vektoren für *T. kodakarensis* und *E. coli* wurden entwickelt, wobei sowohl Selektionsstrategien mit $\Delta trpE$ Komplementation als auch Simvastatin-Resistenz verwendet wurden [Santangelo *et al.*, 2008a, Hileman und Santangelo, 2012]. Bei *P. abyssi* wurde der Shuttle-Vektor pYS2 mit dem *pyrE* Gen von *S. acidocaldarius* über Spheroplasten- und PEG-vermittelte Transformation in einen *pyrE* defizienten Wirtstamm integriert [Lucas *et al.*, 2002]. Zudem wurden auch Systeme zur gezielten Überexpression von Genen sowie der Produktion von Fusionsproteinen und sekretorischen Proteinen etabliert. Der bereits erwähnte Promotor der Glutamatdehydrogenase (*gdh*, *tk1431*) [Matsumi *et al.*, 2007], der Promotor eines Zelloberflächen Glykoproteins (= cell surface glycoprotein, *csg*, *tk0895*) sowie der heterologe Promotor des Histon-kodierenden *hmtB* Gens aus *Methanothermobacter thermautotrophicus* sind geeignet um hohe Expressionsraten in *T. kodakarensis* zu ermöglichen [Mueller *et al.*, 2009, Takemasa *et al.*, 2011]. Häufig wurde dabei auf die Selektions- bzw. Gegenselektionsstrategie mit dem *pyrF* Marker zurückgegriffen. Ein *T. kodakarensis* Stamm mit Deletionen von *tk1827* und *tk1761*, beides Gene die für β -Glykosidasen kodieren, wurde kürzlich erzeugt. Dieser dient als optimierter Wirtstamm für ein *in vivo* β -Glykosidase Genreporter-System [Santangelo *et al.*, 2010].

1.3. Zuckermetabolismus in *P. furiosus*

Für heterotroph, fermentativ wachsende Organismen wie *P. furiosus* stellen in allen drei Domänen Polysaccharide die Hauptquelle für Kohlenstoff dar. Als Kohlenstoffquelle dienen α -glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate wie Stärke und Maltose [Brown *et al.*, 1990]. Auch β -glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate wie Cellobiose [Koning *et al.*, 2001], Laminarin [Voorhorst *et al.*, 1999], β -Glucan und einige lösliche Formen der Cellulose [Bauer *et al.*, 1999] können verwertet werden. Vor einigen Jahren wurde zusätzlich Chitin als Wachstumssubstrat von *P. furiosus* beschrieben [Gao *et al.*, 2003]. Ferner kann *P. furiosus* auch Pyruvat als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen [Schäfer und Schönheit, 1993], wobei jedoch noch nicht bekannt ist wie Pyruvat in die Zellen aufgenommen wird. Die Polysaccharide werden stufenweise durch verschiedene Enzyme zu Monosacchariden wie Hexosen, z.B. Glukose, oder Pentosen, z.B. Arabinose, hydrolysiert. Dies erfolgt zunächst extrazellulär, wobei die Polysaccharide durch spezifische extrazelluläre Glykosidasen zu Oligosacchariden hydrolysiert werden. Diese werden anschließend über Bindeprotein-abhängige, substratspezifische ABC-Transporter in die Zelle transportiert.

Der Metabolismus der Zucker in der Zelle erfolgt über wenige, hochkonservierte Wege. Der Abbau von Glukose zu Pyruvat verläuft meist über den Emden-Meyerhof-Weg (EM), der auch allgemein als Glykolyse bezeichnet wird. Alternativ können der Entner-Doudoroff-Weg (ED) oder der Pentosephosphatweg von vielen Organismen genutzt werden. Während die Zuckerstoffwechselwege und deren Regulation bei Eukarya und Bacteria schon lange im Blickpunkt der Forschung stehen und viele Erkenntnisse gewonnen wurden, wurden für die Archaeen nur wenige Daten und Erkenntnisse generiert [Verhees *et al.*, 2003]. In vergleichenden Studien der glykolytischen Stoffwechselwege wurde ermittelt, dass diese sich bei den hyperthermophilen und halophilen

Archaea in zahlreichen Punkten von den klassischen EM und ED-Stoffwechselwegen der Eukarya und Bacteria unterscheiden [Siebers und Schönheit, 2005].

In *P. furiosus* erfolgt der Energiemetabolismus von Glukose bzw. Glukose-6-Phosphat zu Pyruvat über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg (vgl. Abb. 1.3). Der Hauptunterschied zur herkömmlichen Glykolyse besteht in der Wirkung von alternativen Enzymen und Enzym-Familien. So treten nicht ATP-, sondern ADP-abhängige Kinasen auf, darunter eine ADP-abhängige Glukokinase (PF0312) und Phosphofruktokinase (PF1784) [Siebers und Schönheit, 2005]. Bereits der erste Schritt der Glykolyse, die Phosphorylierung von Glukose, erfolgt durch die Archaeen-spezifische ADP-abhängige Glukokinase. Die weitere Isomerisierung zu Fructose-6-Phosphat wird durch eine Glucose-6-Phosphat-Isomerase (GPI) katalysiert. Eine ADP-abhängige Phosphofruktokinase phosphoryliert dieses Zwischenprodukt weiter zu Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP). In *P. furiosus* setzt anschließend eine zum archaeellen Typ I gehörige FBP-Aldolase Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat um. Die Triosephosphatisomerase (TIM) ist in der Lage, beide Produkte in einander zu überführen. Eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR), welche Ferredoxin anstelle von NAD^+ als Elektronenakzeptor benutzt [Verhees *et al.*, 2003, Matsubara *et al.*, 2011], katalysiert danach die irreversible und nicht-phosphorylierende Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 3-Phosphoglycerat in nur einem Schritt. Die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat erfolgt durch die Phosphoglyceratmutase (PGAM). Durch die Enolase wird aus 2-Phosphoglycerat Phosphoenolpyruvat und daraus durch eine Pyruvatkinase schließlich Pyruvat. Die weitere Verstoffwechselung von Pyruvat erfolgt bei allen Archaeen über die Umwandlung zu Acetyl-CoA durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase. Dieses kann wiederum durch die Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetat umgesetzt werden (zusammengefasst von [Siebers und Schönheit, 2005]).

Die Gluconeogenese ist quasi eine Umkehrung der Reaktionsfolgen der Glykolyse, bei der aus Pyruvat Glukose-6-Phosphat synthetisiert wird (vgl. Abb. 1.3). Da einige Enzyme der Glykolyse bzw. des EM-Wegs ihre Reaktionen reversibel katalysieren, treten diese auch bei der Gluconeogenese auf. Jedoch sind einige Reaktionen des EM-Wegs nicht umkehrbar und daher werden für diese Schritte in der Gluconeogenese spezifische Enzyme benötigt. Zu diesen gehört in *P. furiosus* die Phosphoenolpyruvat (PEP)-Synthetase durch die Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat phosphoryliert wird. Jedoch scheint die PEP-Synthetase in *P. furiosus* auch glykolytische Aktivität zu besitzen und nicht nur auf die Gluconeogenese beschränkt zu sein [Siebers und Schönheit, 2005]. Des Weiteren werden für die Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat bei der Gluconeogenese zwei Enzymaktivitäten benötigt. Nach der Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat durch die Phosphoglyceratkinase (PGK) wird 1,3-Bisphosphoglycerat durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, PF1874) weiter in GAP umgesetzt. Eine Besonderheit bei der Dephosphorylierung von FBP zu Fructose-6-Phosphat ist, dass die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBP, PF0613) bei Archaeen sowohl Kinase- als auch Aldolase-Aktivität aufweist. Durch die Kopplung der Enzymaktivität der FBP-Aldolase mit der Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) wird die Katalyse in Richtung Gluconeogenese ermöglicht [Sato *et al.*, 2004, Say und Fuchs, 2010].

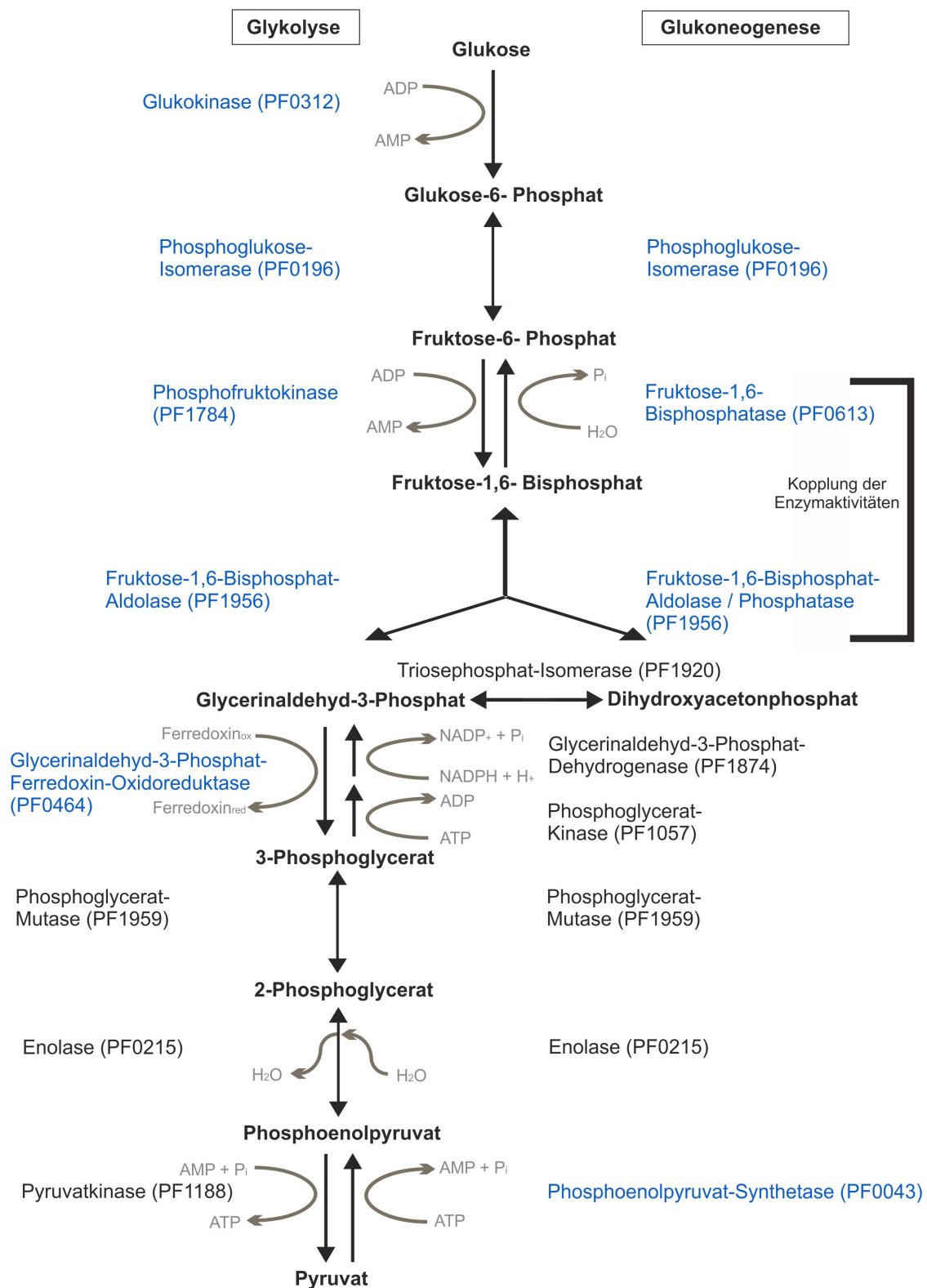


Abbildung 1.3.: Der modifizierte Embden-Meyerhof-Weg in Archaea. Enzyme in Blau sind charakteristisch bei Archaea. Nach Sato und Atomi [Sato und Atomi, 2011]

Wächst *P. furiosus* auf Kohlenhydraten erfolgt die Aufnahme der durch extrazelluläre Enzyme entstandenen Spaltprodukte in die Zelle über sogenannte Bindeprotein-abhängige ABC-Transporter (ABC = ATP-binding cassette) [Koning *et al.*, 2002]. Die ABC-Transporter beziehen die, für den aktiven Substrattransport notwendige Energie aus der Hydrolyse von ATP. Typischerweise erkennt und bindet das Bindeprotein des Transporters das Substrat mit hoher Affinität ($K_m = 20\text{-}150\text{ nM}$) und Spezifität. In *P. furiosus* wird die Aufnahme von α - und β -Glykosiden durch unterschiedliche Transporter bewerkstelligt. Cellobiose und die meisten anderen β -Glykoside werden durch ein induzierbares, für Cellobiose hochaffines Transportsystem aufgenommen [Koning *et al.*, 2001]. Für die Aufnahme von α -Glykosiden gibt es zwei verschiedene ABC-Transportsysteme. Das erste System ist ein Trehalose/Maltose (TM)-ABC-Transporter, der mit großer Spezifität die Aufnahme von Maltose und Trehalose vorantreibt, jedoch nicht in der Lage ist, einen anderen Zucker zu transportieren [Xavier *et al.*, 1996, Horlacher *et al.*, 1998]. Weiterhin wurde in *P. furiosus* ein Maltodextrin (MD)-Transporter nachgewiesen. Für diesen konnte bisher ausschließlich die Aufnahme von Maltodextrinen, also Maltotriose und größeren Malto-Oligosacchariden nachvollzogen werden [Koning *et al.*, 2002]. TM- und MD-Transportsysteme werden beide induziert, wenn das entsprechende Substrat im Medium vorhanden ist [Lee *et al.*, 2006]. Im Genom von *P. furiosus* sind die Gene, welche für die verschiedenen Untereinheiten des TM- bzw. MD-Transporters kodieren, jeweils in einem Operon zusammengefasst und werden damit gemeinsam reguliert [Lee *et al.*, 2003]. Die Regulation von Glykolyse und Gluconeogenese ist ein komplexer Prozess, der sowohl auf DNA-Ebene über die Genexpression als auch posttranslational auf Enzymebene stattfinden kann. Einige klassische Regulationspunkte scheinen jedoch bei Archaeen nicht vorhanden zu sein. Während bei Eukarya und Bacteria z.B. die Aktivität von Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase durch allosterische Regulation stringent eingestellt werden kann, scheint die Art der Regulation der Enzymaktivität bei Archaeen generell eine geringe Rolle zu spielen [Tuininga *et al.*, 1999]. Jedoch konnte durch Analyse der Genexpression mit Microarray-Versuchen ermittelt werden, dass die Produktionsrate von Enzymen der Gluconeogenese in *P. furiosus* Zellen, die auf Peptiden gezogen wurden, deutlich höher war, als in Zellen, die auf Kohlenhydraten wuchsen [Lee *et al.*, 2005, Kanai *et al.*, 2007]. Umgekehrt gilt auch, dass die mRNA für Enzyme der Glykolyse bei Wachstum auf Kohlenhydraten hoch reguliert wird. Somit erscheint es naheliegend, dass in *P. furiosus* glykolytische und gluconeogenetische Enzyme vor allem auf Transkriptionsebene kontrolliert werden [Verhees *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2008].

1.4. Transkription bei Archaeen und Eukaryoten

Sämtliche lebende Zellen besitzen DNA als zentralen Speicher ihrer Erbinformation. Die Verarbeitung der genetischen Informationen der DNA und deren Umschreibung in Proteine geschieht über das meist kurzlebige Intermediat mRNA. Die bei der Transkription durchgeführte Synthese von RNA mittels einer DNA-Matrize ist somit der erste Schritt der Genexpression. Bei detaillierten Studien der Transkriptionsmaschinerien aller Domänen wurde die stärkste Übereinstimmung zwischen den archaeellen und eukaryotischen Transkriptionssystemen ermittelt [Thomm und Wich, 1988, Langer *et al.*, 1995, Bell und Jackson, 1998]. Die archaeelle Transkriptionsmaschinerie

stellt im Vergleich zur eukaryotischen eine vereinfachte und weniger komplexe Form dar, die eine geringere Anzahl von Polymerase-Typen und Transkriptionsfaktoren einbezieht (vgl. Abb. 1.4) [Thomm und Hausner, 2006, Werner, 2008]. Allgemein nimmt man an, dass die archaeelle Transkriptionsmaschinerie die ursprünglichere ist und größere Ähnlichkeiten mit dem gemeinsamen Vorläufer von Eukarya und Archaea aufweist [Kyrpides und Ouzounis, 1999]. Die Untersuchung der Transkription in Archaeen verschafft somit nicht nur Einblicke in die Biologie archaeeller Zellen, sondern lässt auch Rückschlüsse auf die experimentell begrenzt zugängliche Transkriptionsmaschinerie von Eukaryoten zu. Ein Vergleich der Funktionsweisen der Faktoren, welche in Archaeen und Eukaryoten konserviert sind, kann unser durch Sequenz- und Strukturanalysen erlangtes evolutionsbiologisches Verständnis vertiefen.

Für den basalen Transkriptionsprozess mit archaeellen RNA-Polymerasen (RNAPs) sind *in vitro* lediglich die beiden Initiationsfaktoren TBP (TATA-Box-Bindeprotein) und TFB (Transkriptionsfaktor B) essentiell (vgl. Abb. 1.4) [Hausner *et al.*, 1996, Qureshi *et al.*, 1997]. Bei Eukarya hingegen müssen für eine effiziente und spezifische Transkriptionsinitiation neben den Orthologen von TBP und TFB (TFIIB) noch weitere Transkriptionsfaktoren vorhanden sein (vgl. Abb. 1.4). Auch im Genom der meisten Archaeen liegen die Sequenzen für weitere Transkriptionsfaktoren vor [Aravind und Koonin, 1999, Geiduschek und Ouhammouch, 2005]. Der Faktor TFE, ein Homolog der eukaryotischen TFIIE α -Untereinheit ist, *in vitro* nicht essentiell für die basale Transkription [Ohkuma *et al.*, 1995]. Dennoch konnte ein leicht stimulierender Effekt auf die *in vitro* Transkription bei limitierenden TBP-Konzentrationen sowie eine Stabilisierung des offenen Präinitiationskomplexes (PIK) durch TFE nachgewiesen werden [Grünberg *et al.*, 2007]). Ein weiterer Transkriptionsfaktor bei Archaeen ist der Transkriptionsfaktor S (TFS), ein Homolog des eukaryotischen Transkriptionsfaktors TFIIS. Dieser ist an der Korrekturfunktion der RNAP nach dem Falscheinbau eines Nukleotides beteiligt, indem er die Hydrolyse der RNA am 3'-Ende des Transkriptes induziert [Wind und Reines, 2000, Lange und Hausner, 2004]. Kommt es zum Falscheinbau, pausiert die RNAP ('Transkriptionsarrest') und das 3'-terminale Nukleotid wird vom Matrizen-DNA-Strang gelöst. Die RNAP bewegt sich entgegengesetzt zur Transkriptionsrichtung am Matrizenstrang ('Backtracking') [Komissarova und Kashlev, 1997] und das 3'-Ende der RNA wird in die Pore der RNAP gedrückt [Sydow und Cramer, 2009]. Durch die TFS induzierte Abspaltung eines Dinukleotides wird ein neues 3'-Ende der wachsenden RNA erzeugt und im aktiven Zentrum der RNAP positioniert, die Elongation kann fortgesetzt werden [Lange und Hausner, 2004].

Neben den strukturellen Homologien der Proteinkomponenten der Transkriptionsmaschinerien besitzen auch die DNA-Promotorelemente, welche für die Initiation der Transkription entscheidend sind, eine große Ähnlichkeit im Aufbau. Teil des Promotors sind das TATA-Element, das sieben Basenpaare stromaufwärts davon liegende B recognition element (BRE) sowie ein Initiator-Element (Inr) [Bartlett, 2005]. Die TATA-Box ist eine acht Basenpaar umfassende, A/T-reiche Sequenz bei etwa -30 bis -25 relativ zum Transkriptionsstart, die wesentlich zu der Bindungsfrequenz von TBP und der Initiationsfrequenz der RNAP am Promotor beiträgt [Hausner und Thomm, 2001]. Der exakte Transkriptionsstart (+1) wird im Initiator durch die DNA-Sequenz, genauer über ein Pyrimidin-Purin Basenpaar an Position -1 und +1, festgelegt [Bartlett, 2005]. Der am besten charakterisierte eukaryotische Promotor erstreckt sich ca. +/-35 bp um den Transkriptionsstart.

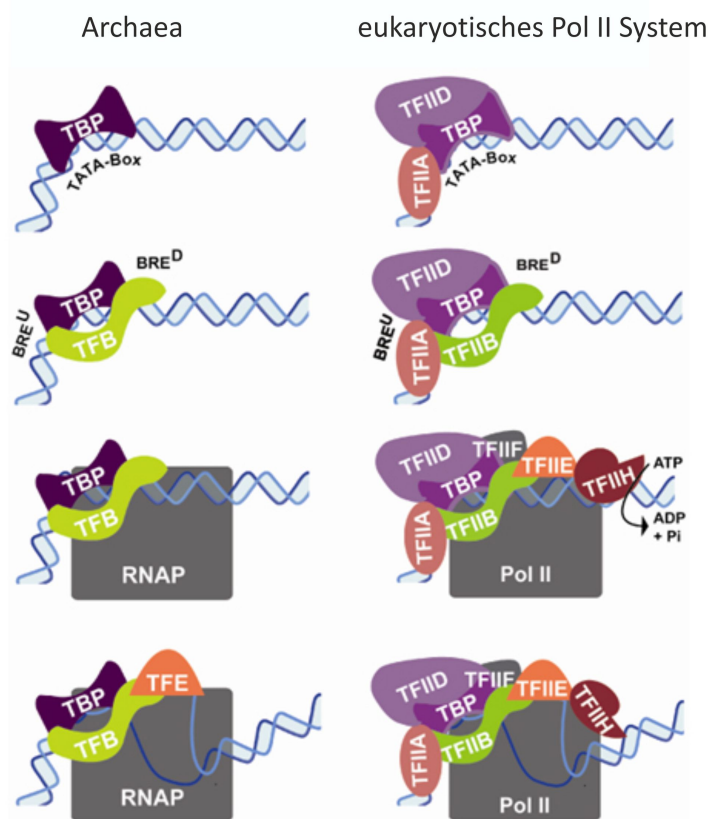


Abbildung 1.4.: Schematische Übersicht der Transkriptionsinitiation bei Archaea und dem eukaryotischen System (Abbildung von Mirjam Zeller [Zeller, 2011], hinterlegt auf der Homepage des Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Die essentiellen Motive sind auch hier das TFIIB Erkennungselement (BRE -37 bis -32), ein TATA-Element (-31 bis -26), ein Initiator-Element (-2 bis +4) und zusätzlich ein stromabwärts gelegenes Core-Promotor-Element (DPE = 'downstream promoter element'; +28 bis +32); zusammengefasst durch Smale und Kadonaga [Smale und Kadonaga, 2003]. Diese Grundstruktur ist stark konserviert, allerdings gibt es dennoch Variationen in der Promotorstruktur, deren Aufgabe in der Regulation der Genexpression liegt [Butler und Kadonaga, 2002].

Der Transkriptionszyklus lässt sich in drei Phasen unterteilen von denen jede durch verschiedene Faktoren und Sequenzen reguliert wird. Die Initiation der Transkription beginnt bei Archaeen wie bei Eukaryoten mit der Bindung von TBP bzw. der eukaryotischen TBP Untereinheit des TFIID-Komplexes (TFIID = Komplex aus TBP und TBP assoziierten Faktoren, den TAFs). Das sattelförmige TBP erkennt und bindet zuerst an das TATA-Element in der Nähe des Transkriptionsstarts und bewirkt somit eine Krümmung der DNA um etwa 90° [Kosa *et al.*, 1997, Gohl *et al.*, 1995, Rowlands *et al.*, 1994]. Anschließend kann TFB direkt über ein Helix-Turn-Helix-Motiv mit der purinreichen BRE-DNA interagieren. Gleichzeitig kann TFB auch mit TBP in Kontakt treten, wodurch der TBP/DNA-Komplex stabilisiert und die Orientierung des Transkriptionskomplexes festgelegt wird [Bell *et al.*, 1999, Littlefield *et al.*, 1999]. TFB ist im Anschluss für die Rekrutierung der RNAP verantwortlich. Indem die RNAP die Plattform aus TBP/TFB und Promotor-DNA erkennt und um das Inr bindet wird der Präinitiationskomplex gebildet [Hausner *et al.*, 1996]. Auch bei Eukaryoten bindet TBP, welches als Untereinheit im TFIID-Komplex vorliegt, im ersten Schritt an die TATA-Box. Über Rekrutierungen und Interaktionen mit TFIIA und TFIIB, der Pol-II sowie

TFIIF, TFIIE und TFIIH wird der Komplex stabilisiert. Die gebundene Pol-II bildet somit zusammen mit den generellen Transkriptionsfaktoren den Präinitiationskomplex. Zudem können die Transkriptionsfaktoren die Chromatin-Struktur verändern und mit anderen Komponenten des Transkriptionsapparates interagieren [Kornberg und Lorch, 1999]. Während der Assemblierung des geschlossenen Komplexes herrschen nur schwache Kontakte zwischen RNAP und DNA. Die Ausbildung des offenen Komplexes geht mit einer Umstrukturierung, dem lokalen Aufschmelzen der DNA um den Transkriptionsstart und der Positionierung des kodierenden DNA-Stranges im aktiven Zentrum der RNAP einher [Hahn, 2004, Forget *et al.*, 1997, Langelier *et al.*, 2001]. Dieser Vorgang ist bei Archaeen unabhängig von der Hydrolyse von ATP [Hausner und Thomm, 2001]. Bei der Bildung des offenen Komplexes zeigt hingegen die eukaryotische Pol-II eine Besonderheit. Sie benötigt als einzige sowohl eine ATP-abhängige DNA-Helikase-Aktivität von TFIIH zum Aufschmelzen der DNA, als auch die Phosphorylierung der C-terminalen-Domäne (CTD). Die CTD von Rpb1 beinhaltet repetitive Sequenzen, welche verschiedenen, regulatorischen Phosphorylierungen unterworfen werden. Bei der Rekrutierung an den Promotor liegt die Pol-II dephosphoryliert vor. Durch die Phosphorylierung bei der Initiation wird der Präinitiationskomplex destabilisiert und das Lösen vom Promotor unterstützt. Im Anschluss daran ist die CTD Angriffspunkt verschiedenster Faktoren, die Initiation, Elongation und Termination beeinflussen sowie von Enzymen, die für die prä-mRNA Modifizierung nötig sind [Palancade und Bensaude, 2003, Yan und Gralla, 1997].

Der Übergang von Initiationskomplexen zur produktiven RNA-Synthese ist gekennzeichnet durch eine Phase mit kurzen, abortiven Transkripten und dem Lösen der RNAP von der Promotorplattform ('promoter clearance'). Durch die geringere Stabilität von kurzen, synthetisierten RNA-Stücken neigt die RNAP in dieser Phase zum Pausieren und Arretieren [Holstege und Timmers, 1997, Holstege *et al.*, 1997, Rivetti *et al.*, 2003]. Erst durch die Synthese eines stabileren ca. 10-15 Nukleotide langen Transkripts erfolgt der Übergang zu Elongationskomplexen (>15 nt) [Rivetti *et al.*, 2003]. Dabei löst sich die Polymerase endgültig von der Promotor-DNA und die Transkriptionsfaktoren dissoziieren ab [Geiduschek und Ouhammouch, 2005]. In einigen Fällen bleiben Teile der generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) weiter an der Promotor-DNA gebunden und erlauben so eine schnellere Reinitiation [Yudkovsky *et al.*, 2000, Xie und Reeve, 2004]. Es kommt zu weiteren Umlagerungen im Transkriptionskomplex, der nun auch durch die entstehende RNA stabilisiert wird. In der Elongationsphase angekommen synthetisiert die RNAP die RNA hoch prozessiv. Eine Vielzahl von Faktoren, welche die Elongation beeinflussen, Chromatin-modifizierende sowie RNA-Prozessierungsfaktoren, nehmen den Kontakt zur elongierenden Pol-II auf [Bentley, 2005]. Bei Archaeen wird die Elongation beendet sobald die RNAP auf ein oder mehrere Terminations-signale stößt. Dies führt zur Destabilisierung des Transkriptionskomplexes und zur Freisetzung der RNAP.

1.5. RNA-Polymerasen

Die RNAPs sind in allen Lebewesen vorkommende Enzyme deren Funktion die Transkription ist, also die Synthese von RNA anhand einer DNA-Matrize. Die Polymerisation der zum kodierenden DNA-Strang komplementären RNA-Bausteine, der Ribonukleosidtriphosphate (NTPs), erfolgt mit herausragender Geschwindigkeit und Präzision [Edwards *et al.*, 1991]. Das Enzym bindet die korrekten NTPs, fügt Nukleosidmonophosphate in die von 5'- nach 3'-Richtung wachsende RNA an und setzt das entstehende Pyrophosphat frei. Meist handelt es sich bei RNAPs um hochentwickelte Proteinkomplexe. Nur in Mitochondrien und Chloroplasten von Eukaryoten existieren daneben auch single-subunit RNAPs [Gaspari *et al.*, 2004, Kanamaru und Tanaka, 2004]. Obwohl sich die multisubunit RNAPs der Archaea, Bacteria [Grohmann *et al.*, 2009, Darst, 2001] und Eukarya in vielerlei Hinsicht stark ähneln (vgl. Abb. 1.5) [Jun *et al.*, 2011], weisen sie dennoch einige grundlegende Unterschiede auf.

Während die Bacteria und Archaea nur einen einzigen Typ an RNA-Polymerase besitzen, durch den alle zellulären RNAs katalysiert werden, existieren in eukaryotischen Zellen drei bis fünf verschiedene Ausführungen der RNAP (I, II, III, IV und V) [Grohmann *et al.*, 2009, Pikaard und Tucker, 2009, Ream *et al.*, 2009], die jeweils auf die Synthese definierter RNA-Arten spezialisiert sind [White, 2011, Vannini und Cramer, 2012]. So synthetisiert in Eukaryoten die Pol-I hauptsächlich ribosomale RNA, Pol-II die prä-messenger RNA sowie micro (mi) RNAs und small nuclear (sn) RNAs und schließlich Pol-III die tRNAs und andere kleine RNAs. Des Weiteren treten bei Pflanzen zusätzlich zwei spezifische RNAP-Typen, Pol-IV und Pol-V, auf, welche jedoch nicht essentiell sind und auf die nicht näher eingegangen wird [Pikaard und Tucker, 2009, Ream *et al.*, 2009]. Die drei eukaryotischen RNAPs zeigen durch die Spezialisierung ihrer Funktionen in der Zelle Unterschiede in Größe und Anzahl der Untereinheiten (Pol-I 14, Pol-II 12 und Pol-III 17), wobei einige Untereinheiten einzig in einem Polymerase-Typus, andere wiederum in allen drei vorkommen oder Homologien zu RNAPs anderer Domänen aufweisen (vgl. Abb. 1.6) (zusammengefasst von Cramer [Cramer *et al.*, 2008]). Die Kernuntereinheiten Rpb1, Rpb2, Rpb3 und Rpb11 zeigen deutliche sequenzielle und strukturelle Übereinstimmungen mit Untereinheiten der Pol-I, Pol-II, dem bakteriellen Enzym, sowie der archaeellen RNAP [Zhang *et al.*, 1999, Kusser *et al.*, 2008]. Dahingegen sind die Untereinheiten Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 und Rpb12 hauptsächlich innerhalb der drei eukaryotischen RNAPs (I, II und III) konserviert. Die Pol-II kann dabei generell als Vorläufer angesehen werden, aus dem sich Pol-I und -III entwickelt haben könnten [Kwapisz *et al.*, 2008]. Die Untereinheiten der RNAP von *P. furiosus* (RpoB, RpoA', RpoA'', RpoD, RpoE', RpoF, RpoK, RpoL, RpoH, RpoN, RpoP), weisen umfassende Homologien zu Untereinheiten der eukaryotischen Pol-II auf [Thomm und Hausner, 2006, Langer *et al.*, 1995].

Von den eukaryotischen Polymerasen, besonders von Pol-II aus *S. cerevisiae*, sind bis heute viele Strukturdaten erhoben worden. Für Archaeen wurde zunächst die Cryo-elektronenmikroskopisch bestimmte Struktur von *P. furiosus* publiziert [Kusser *et al.*, 2008]. Mittlerweile sind auch die Röntgenkristallstrukturen der RNAP der Crenarchaeota *S. solfataricus* [Hirata *et al.*, 2008b] und *S. shibatae* [Korkhin *et al.*, 2009] verfügbar. Der Vergleich von eukaryotischer [Cramer *et al.*, 2001, Armache *et al.*, 2005], archaeeller [Hirata *et al.*, 2008b, Kusser *et al.*, 2008] und bakterieller [Zhang *et al.*, 1999]

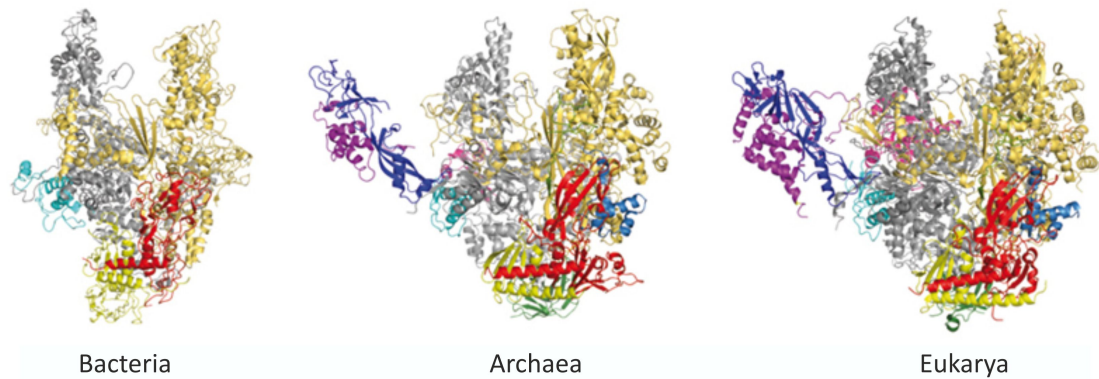


Abbildung 1.5.: Übersicht der Gesamtstruktur der RNAPs aus Bacteria (*Thermus aquaticus* (1HQM) [Minakhin *et al.*, 2001]), Archaea (*Sulfolobus shibatae* (2Y0S) [Wojtas *et al.*, 2011]) und Eukarya (*Saccharomyces cerevisiae* (1Y1V) [Kettenberger *et al.*, 2006]). Homologe Untereinheiten sind in identischer Farbe dargestellt. Das Modell wurde mit Hilfe der PyMOL Software erstellt.

RNAP-Strukturen half bei der Identifizierung von konservierten Domänen. Strukturanalysen und Aminosäure-Sequenzvergleiche der Untereinheiten der RNAPs legen nahe, dass alle RNAPs auf ein gemeinsames Vorläuferenzym zurückgehen [Sweetser *et al.*, 1987, Lane und Darst, 2010]. Da mit der Struktur auch die grundlegenden Mechanismen der Transkription in allen RNAPs erhalten sind, deutet dies auf eine sehr frühe Entstehung des basalen Transkriptionsmechanismus in der Evolution hin.

Ein besonders hoher Grad an Konservierung zeigt sich im Bereich der großen Spalte ('cleft') und des aktiven Zentrums der RNAPs. Das Grundgerüst der Polymerase, das auch das katalytische Zentrum des Enzyms beinhaltet, wird durch die großen Untereinheiten RpoA und RpoB in Archaeen bzw. Rpb1 und Rpb2 in Pol-II geschaffen. Zusammen bilden sie eine Klammer, in deren Spalte sich das aktive Zentrum befindet. Häufig liegen die Untereinheiten in den Archaeen in RpoA' und RpoA'' bzw. RpoB' und RpoB'' gespalten vor [Pühler *et al.*, 1989]. Die durch die großen Untereinheiten gebildete Klammer ist beweglich und tritt in verschiedenen Konformationen auf. Die weiteren Untereinheiten (RpoD, RpoL, RpoN, RpoP, RpoK, RpoH und bei Crenarchaeota RpoG) sind für die Assemblierung notwendig und in der Peripherie der großen Untereinheiten angeordnet. Gemeinsam bilden all die genannten Untereinheiten das Kernenzym an das wiederum der dissoziierbare Rpb4/7 bzw. RpoE'/RpoF-Komplex angegliedert ist. 2007 wurden das archaeele Homolog von Rpb8, RpoG, und die Untereinheit Rpo13, welche spezifisch für RNAPs von Crenarchaeota ist, identifiziert [Koonin *et al.*, 2007, Kwapisz *et al.*, 2008, Werner und Grohmann, 2011]. Das Homolog von Rpo13 wurde in der Kristallstruktur mit zwei N-terminalen α -Helices, welche ein HTH-Motiv bilden, in der Vertiefung zwischen der Klammer und RpoH detektiert [Korkhin *et al.*, 2009, Wojtas *et al.*, 2011]. Bei Eukaryoten ist an dieser Position ein Teil der C-terminalen Domäne von Rpb5 lokalisiert. Für die Euryarchaeota hingegen wurde kein vergleichbares Homolog ermittelt. Zu Rpb9 gibt es zwar keine direkte homologe Untereinheit in RNAPs der Archaeen, jedoch ist der Transkriptionsfaktor S verwandt mit Rpb9 [Lange und Hausner, 2004, Werner, 2008]. Einem evolutionsbiologischen Entstehungsmodell für multisubunit RNAPs zufolge sind zusätzli-

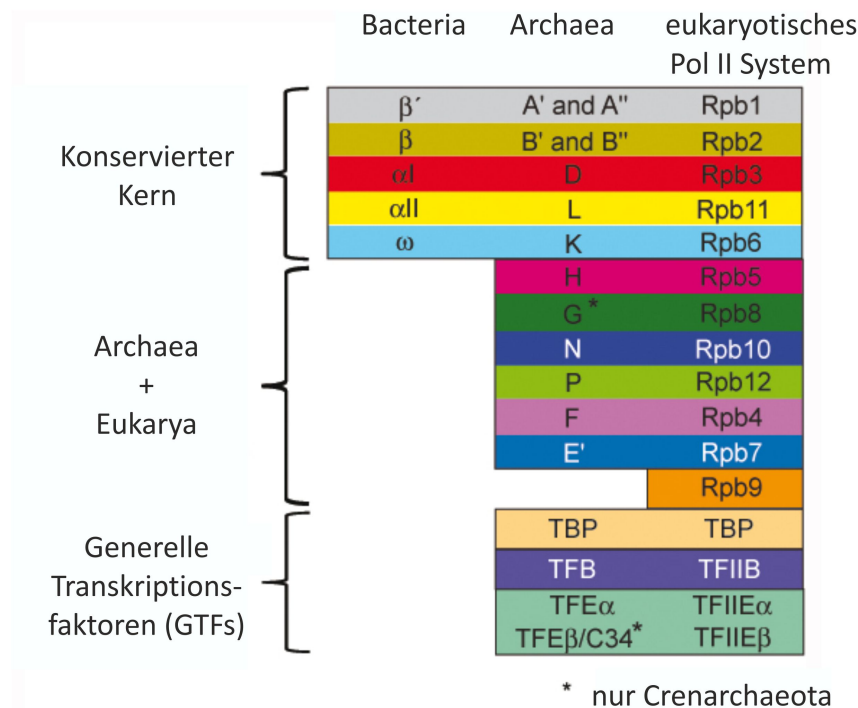


Abbildung 1.6.: **RNAP Untereinheiten in den drei Domänen des Lebens.** Gezeigt ist die Zusammensetzung der RNAPs von Bacteria, Archaea und dem Pol-II System der Eukarya. Homologe und ähnliche Untereinheiten sind nebeneinander angeordnet. Zu Rpb8 wurden bisher lediglich in den Reichen der Cren- und Korarchaeota homologe Untereinheiten entdeckt (RpoG), (nach [Cramer *et al.*, 2008] erweitert und modifiziert. Bildmaterial der Homepage des Lehrstuhls für Mikrobiologie, Universität Regensburg.)

che Untereinheiten in RNAPs von Eukaryoten und Archaeen ehemalige Transkriptionsfaktoren, die mit der Zeit dauerhaft von den RNAPs gebunden wurden [Carter und Drouin, 2010]. Dafür sprechen Sequenzvergleiche, welche Homologien von Pol-II Transkriptionsfaktoren zu Pol-I und Pol-III Untereinheiten aufzeigen. Darüber hinaus ist über die Aufgaben der kleineren Untereinheiten wie RpoH, RpoK, RpoL, RpoN, und RpoP, welche für die Assemblierung und die Funktionalität des Enzyms wichtig sind, wenig bekannt.

1.6. Motivation

Ein Großteil des Wissens über fundamentale biologische Prozesse stammt aus der Erforschung von einfachen und experimentell kontrollierbaren Arten wie etwa *E. coli* oder *S. cerevisiae*. Später konnten diese grundlegenden Gesetzmäßigkeiten auch in komplexeren und höher entwickelten Arten verifiziert werden. Dennoch bleiben einfache Modellorganismen wichtiger Bestandteil für die weitere Erforschung fundamentaler zellulärer Prozesse. Thermophile Archaeen stehen dabei im Blickpunkt der Forschung, weil diese thermostabile Enzyme besitzen und evolutionsbiologisch als sehr ursprüngliche Organismen angesehen werden. Zahlreiche Ansätze zur Untersuchung der Anpassungsstrategien der Hyperthermophilen an die extrem hohen Umgebungstemperaturen haben bereits viele physiologisch einzigartige Eigenschaften der Archaeen aufgezeigt. Da *Thermococ-*

cales bei Temperaturen über 80 °C wachsen, müssen alle ihre Zellkomponenten wie Membranlipide, Nukleinsäuren und Proteine extrem thermostabil sein, um die Vitalität der Zelle bei diesen Temperaturen zu gewährleisten. Dadurch wird für diese Organismen und ihre thermostabilen Enzyme ein enormes biotechnologisches Potential angenommen. Weiterhin sind *Thermococcales* in der Lage, ein breites Spektrum an Substraten zu umzusetzen, was oft über neuartige oder modifizierte metabolische Wege bzw. Enzyme geschieht. Es ist bekannt, dass die *Thermococcales* eine Vielzahl von stabilen Enzymen zum Abbau und zur Metabolisierung von Polymeren besitzen, für die ebenfalls ein breites Anwendungsgebiet in der Biotechnologie erwartet werden [Atomi, 2005, Egorova und Antranikian, 2005]. *P. furiosus* kann auf einfachen organischen Medien mit einer hohen Ausbeute an Biomasse kultiviert werden und wird daher seit langem als Modellorganismus für archaeele Biologie, aber auch zur Untersuchung von evolutionsbiologischen Aspekten verwendet. Besonders im Fokus stehen dabei die Mechanismen der DNA-Replikation [Mayanagi *et al.*, 2009, Nishida *et al.*, 2009] und Transkription bzw. deren Regulation [Kanai *et al.*, 2007, Thomm, 2007, Hirata *et al.*, 2008a], sowie der Zucker- und Energiemetabolismus [Verhees *et al.*, 2003, Siebers und Schönheit, 2005]. Aber auch CRISPR-Systeme [Hale *et al.*, 2009] und zelluläre Stressantworten [Clay *et al.*, 2003, Laksanalamai und Robb, 2004, Fujiwara *et al.*, 2008] werden analysiert. Mit der Verfügbarkeit der kompletten Genomsequenz von *P. furiosus* wurden neue Forschungsbereiche eröffnet. Darunter Transkriptom- [Lee *et al.*, 2006, Trauger *et al.*, 2008] und Proteomanalysen [Menon *et al.*, 2009] und andere Genom basierte ('High-Throughput') Strategien [Keese *et al.*, 2010]. Das Genom der meisten Archaeen ist relativ klein und enthält wenig Gene, was diese Organismen für Untersuchungen der Grundprinzipien der Zellfunktionen und deren Evolution ideal macht. Das Genom von *P. furiosus* ist 1,9 Mbp lang und enthält etwa 2.300 annotierte ORFs [Poole *et al.*, 2005]. Trotz Sequenzhomologien konnten nur begrenzt Informationen zu den Funktion einzelner Proteine bzw. deren Zusammenspiel untereinander generiert werden. Des Weiteren kann etwa die Hälfte der annotierten Gene, bzw. die Funktion der daraus resultierenden Proteine nicht zuverlässig vorausgesagt werden kann. Aufgrund der begrenzten Anzahl an vorhandenen genetischen Methoden, konnten Archaeen in der Vergangenheit nur begrenzt und unzureichend untersucht werden. Da heute bei der Wahl eines Modellorganismus auch die Verfügbarkeit von Strategien für genetische Manipulationen ein wichtiges Kriterium ist, war Ziel dieser Arbeit ein genetisches Systems für *Pyrococcus furiosus* zu etablieren. Abhängig von der Fragestellungen und dem Anwendungsgebiet sollten verschiedene genetische Strategien und Verfahren entwickelt werden. Es sollten *P. furiosus*-Stämme generiert werden, welche für Struktur-Funktions-Analysen von RNAP-Mutanten, zur Charakterisierung des Transkriptionsregulators TrmBL2 und für Untersuchungen des Chitin-Abbaus eingesetzt werden können.

2. Die Struktur-Funktions-Analyse bei RpoA''-Mutanten

2.1. Einleitung

1992 wurde erstmals das archaeelle Plasmid pGT5 beschrieben [Charbonnier *et al.*, 1992]. Das 3,45 kbp umfassende Plasmid wurde aus *P. abyssi* isoliert und bildete, nach der Identifizierung des Replikationsursprungs, die Grundlage für die Etablierung erster genetischer Techniken bei den *Thermococcales* [Erauso *et al.*, 1996]. pGT5 wurde mit dem bakteriellen Vektor pLitmus38, einem pUC19 Derivat, fusioniert, um einen potentiellen Shuttle-Vektor zwischen *E. coli* und *P. abyssi* bzw. *S. acidocaldarius* zu erzeugen [Aagaard *et al.*, 1996]. Ausgehend von pGT5 wurde der Shuttle-Vektor pYS2 generiert, indem das *pyrE* Gen aus *S. acidocaldarius* als Selektionsmarker integriert wurde. Ein Uracil-auxotropher *P. abyssi* Stamm konnte erfolgreich durch die PEG vermittelte Spheroplastentransformation mit pYS2 transformiert werden [Lucas *et al.*, 2002]. Obwohl die Transformationseffizienz relativ niedrig war, verblieb pYS2 durch den spezifischen Replikationsursprung sowie den Selektionsmarkern nach der Transformation stabil in *E. coli* und *P. abyssi*, welcher dadurch Uracil-Prototrophie erlangte.

2.1.1. Etablierung des Shuttle-Vektor-Systems, der Transformations- und Selektionsstrategie

P. furiosus enthält natürlicherweise keine extrachromosomale DNA. Der für eine stabile Replikation in *E. coli* und *P. abyssi* konstruierte Shuttle-Vektor pYS2 [Lucas *et al.*, 2002] wurde so modifiziert, dass er für Transformationen von *P. furiosus* genutzt werden konnte. Dabei wurde auf eine Strategie der positiven Selektion durch Erzeugung einer Antibiotikaresistenz zurückgegriffen. Es zeigte sich, dass *T. kodakarensis*, ein verwandter Organismus von *P. furiosus*, sensitiv gegenüber dem Antibiotikum Simvastatin ist. Wie beschrieben ist das Enzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMGCR) essentiell für die Lipid-Biosynthese (vgl. Abb. 2.1) und sensitiv gegenüber der Inhibierung durch Simvastatin und Mevinolin. Daher kann durch hohe Konzentrationen an Simvastatin das Wachstum der Zellen unterdrückt werden. Durch die Überproduktion der HMGCR erlangen die Zellen Resistenz gegenüber dem Statin. Die Verwendung des Simvastatin-Resistenz-Gens ermöglichte, Deletionsmutanten bei *T. kodakarensis* zu erzeugen und diese durch Simvastatin zu selektieren [Matsumi *et al.*, 2007]. Da es naheliegend erschien, dass dieses Selektionsverfahren auch bei *P. furiosus* angewendet werden kann, wurde eine endogene Resistenzkassette gegen Simvastatin erstellt. Dafür wurde eine Genkopie der HMGCR (*hmgcr_{Pf}*) mit der Promotorsequenz des Gens der Glutamat-Dehydrogenase (*Pgdh_{Pf}*) fusioniert (vgl. Abb. 2.2). Da

2.1. Einleitung

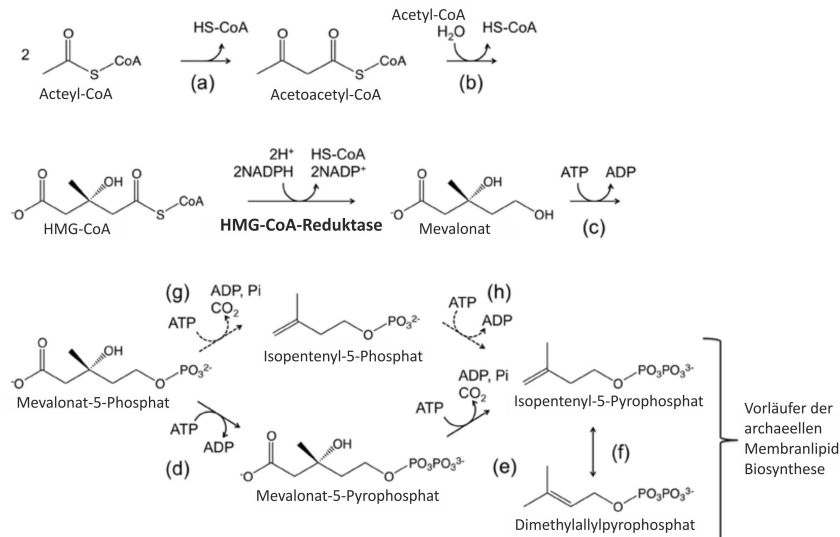


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung des Mevalonat Stoffwechsels der *Thermococcales*. Die gepunkteten Pfeile deuten mögliche Adaptionen der Archaea an [Grochowski *et al.*, 2006, Matsumi *et al.*, 2011]. Katalytische Enzyme sind (a) Acetoacetyl-CoA-Thiolase, (b) HMG-CoA-Synthase, HMG-CoA-Reduktase, (c) Mevalonat-Kinase, (d) Mevalonat-5-Phosphat-Kinase, (e) Mevalonat-5-Pyrophosphat-Decarboxylase, (f) Isopentenyl-5-Pyrophosphat-Isomerase, (g) Mevalonat-5-Phosphat-Decarboxylase, und (h) Isopentenyl-5-Phosphat-Kinase. Abbildung nach Atomi [Atomi *et al.*, 2012]

die GDH konstitutiv exprimiert wird, sollte die Verwendung der *gdh* Promotorsequenz die konstante Überexpression der HMG-CoA-Reduktase gewährleisten. Dies diente dazu den transformierten *P. furiosus* Zellen eine stabile Resistenz gegenüber Simvastatin zu vermitteln. Das *pyrE_{Sa}* Gen des pYS2-Vektors wurde durch den Simvastatin-Resistenzmarker für *P. furiosus* ersetzt und somit pYS3 generiert (vgl. Abb. 2.2) [Waege *et al.*, 2010]. Ziel war es pYS3 für die Transformation und stabile Replikation sowohl in *E. coli* als auch bei *P. furiosus* zu nutzen. Im Folgenden wurde eine Methodik zur Hitzeschock-Transformation von *P. furiosus* entwickelt [Waege *et al.*, 2010], die auf der für *T. kodakarensis* beschriebenen Prozedur basiert [Sato *et al.*, 2003]. Für den pYS3-Shuttle-Vektor betrug die Transformationseffizienz in Kulturflüssigmedium dabei etwa $5 \cdot 10^2$ pro μg Plasmid-DNA. Zur Isolierung von einzelnen Transformanten bzw. zur Erzeugung von Rein-kulturen wurden die Kulturen auf Gelrite-Platten mit $10 \mu\text{M}$ Simvastatin plattiert und inkubiert. Jedoch war hierbei eine deutliche Reduktion der Plattierungseffizienz von 78 % bei Wildtypzellen auf Gelrite-Platten gegenüber 15 % Plattierungseffizienz der Transformanten bei Anwesenheit von Simvastatin zu beobachten. In Flüssigkulturmedium konnte bei Konzentrationen von bis zu $20 \mu\text{M}$ Simvastatin keine Einschränkung der Vitalität der Transformanten festgestellt werden. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass pYS3 stabil mit 1-2 Kopien pro Chromosom in *P. furiosus* verbleibt und die Transformanten bei Simvastatin-Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ vital sind. Bei *P. abyssi* waren für pYS2-Kopienzahlen von 20 bis 30 pro Chromosom bestimmt worden, identisch mit den für wt pGT5 beschriebenen Werten [Erauso *et al.*, 1996, Lucas *et al.*, 2002]. Die Ursache für die Reduktion der Kopienzahl in *P. furiosus* ist zurzeit unbekannt. Insgesamt erschien pYS3 geeignet, um den Shuttle-Vektor auch für die regulierbare Expression von endogenen, thermostabilen Proteinen in *P. furiosus* nutzbar zu machen.

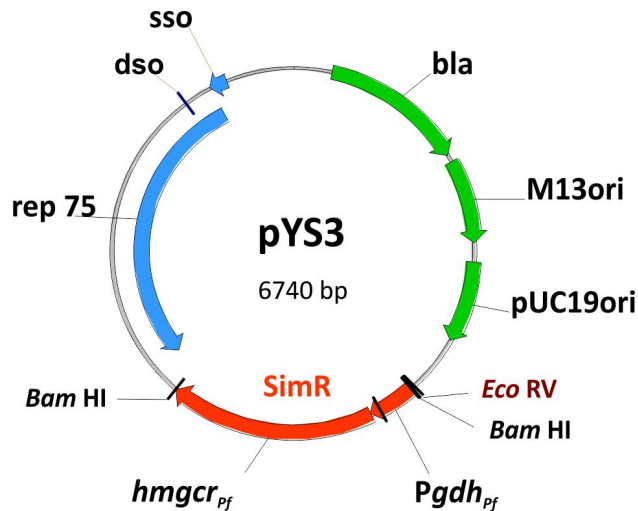


Abbildung 2.2.: Der Shuttle-Vektor pYS3. Die Plasmidabschnitte mit bakteriellem Ursprung sind in grün abgebildet, diejenigen aus dem archaeellen Plasmid in blau. Der zusätzlich integrierte Resistenzmarker gegen das Antibiotikum Simvastatin ist in rot dargestellt.

Das Gen der RpoD-Untereinheit der RNA-Polymerase (*pf1647*) aus *P. furiosus* wurde ausgewählt, um ein Konstrukt zu erstellen, mit dessen Hilfe sich eine Hexahistidin fusionierte Kopie des Gens regulierbar exprimieren lässt. Ein DNA-Fragment bestehend aus dem Promotor der Fructose-1,6-Bisphosphatase (*Pfbp*; PF0613), dem *rpoD* Gen mit einer Sequenz für einen C-terminalen His₆-Tag und dem Histon A1 Terminator (*Thistona1*) aus *P. furiosus* wurde generiert. Das Fragment zur Expression von RpoD-His₆ wurde über geeignete Schnittstellen in den Vektor pYS3 integriert, der im Folgenden als pYS4 bezeichnet wird. Bei der Fructose-1,6-Bisphosphatase handelt es sich um ein gluconeogenetisch aktives Enzym, dessen Expression daher in Abhängigkeit des Metabolismus der Zelle reguliert ist. Die Expression ist bei gluconeogenetischen Bedingungen aktiviert, während bei glykolytischem Wachstum lediglich eine Basalexpression stattfindet [van de Werken *et al.*, 2006]. Dementsprechend sollte auch die Expression der zusätzlichen Polymerase-Untereinheit reguliert werden. Tatsächlich konnte nach der Transformation von pYS4 in *P. furiosus* die induzierbare Expression von RpoD-His₆ verifiziert werden. Weiterhin war es möglich über den His₆-Tag an der RpoD-Untereinheit der RNA-Polymerase komplett assemblierte RNAP-Komplexe aus *P. furiosus* pYS4-Zellen mit nur zwei Reinigungsschritten zu isolieren. Damit bietet die Strategie eine gute Alternative bzw. Ergänzung zum bereits beschriebenen System zur *in vitro* Rekonstitution von archaeeller RNAP aus 11 einzelnen Untereinheiten [Naji *et al.*, 2007]. Die Funktionsanalyse der gereinigten RNAP erfolgte durch *in vitro* Transkriptionsexperimente, wodurch die Aktivität der RNAP demonstriert wurde. Damit konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass mit dem pYS4-Shuttle-Vektor die Überexpression der RpoD-His₆ unter der Kontrolle eines gluconeogenetischen Promotors abhängig vom Substrat im Kulturmedium regulierbar ist [Waage *et al.*, 2010].

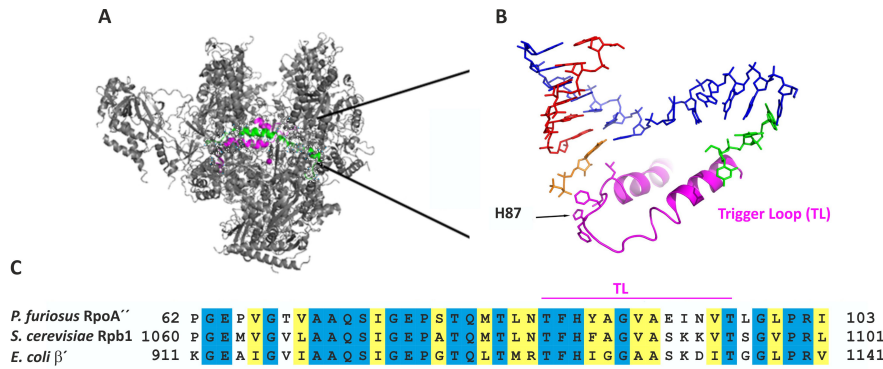


Abbildung 2.3.: **Trigger Loop (TL)**. (A) Position des Trigger Loops in der RNAP und (B) Beteiligung des TL an der RNA-Synthese. (C) Die Konservierung der TL-Sequenz im Vergleich zwischen Archaea, Bacteria und Eukarya. In einem Sequenzalignment des TL aus eukaryotischer RNAP II (*S. cerevisiae*), der archaeellen RNAP (*P. furiosus*) und der bakteriellen RNAP (*E. coli*) sind identische (blau) und konservierte (gelb) Aminosäuren hervorgehoben. Abbildung modifiziert nach Fouqueau [Fouqueau *et al.*, 2013].

2.1.2. RpoA'' und die RNA-Polymerisation

Das Homolog der großen Untereinheit Rpb1 aus *S. cerevisiae* liegt in *P. furiosus* in Form zweier separater Untereinheiten, RpoA' und RpoA'', vor [Pühler *et al.*, 1989]. Da die großen Untereinheiten Rpb1 und Rpb2 bzw. RpoB, RpoA' und RpoA'' das aktive Zentrum der RNA-Polymerase bilden wird postuliert, dass diese für die Transkription essentielle Domänen beinhalten [Werner und Grohmann, 2011]. So lokalisieren in der Rpb1-Untereinheit Regionen und Aminosäurereste, die direkt an der RNA-Synthese involviert sind. Hierbei sind besonders die beiden Regionen der Bridge Helix und des Trigger Loops, die beide in direkter Nachbarschaft zum aktiven Zentrum lokalisieren, zu erwähnen. Die Bridge Helix dirigiert den kodierenden Strang in das aktive Zentrum der RNAP und sorgt dort für die korrekte Positionierung des DNA-RNA-Hybrids [Bar-Nahum *et al.*, 2005]. Die Aminosäuresequenz der Bridge Helix ist in den RNAPs der Archaea, Bacteria und Eukarya hoch konserviert (vgl. Abb. 2.3). Sie wurde als α -helikale Struktur beschrieben, die in Kristallstrukturen in gerader bis leicht gebogener [Cramer *et al.*, 2001, Vassylyev *et al.*, 2007, Hirata *et al.*, 2008b], geknickter [Zhang *et al.*, 1999, Vassylyev *et al.*, 2002] oder intermediärer [Tuske *et al.*, 2005] Konformation nachgewiesen wurde [Weinzierl, 2010]. Studien von Elongationskomplexen belegten, dass in Abhängigkeit von der Position der Bridge Helix auch der Trigger Loop als hoch konserviertes mobiles Element in insgesamt fünf verschiedenen Konformationen vorliegen kann [Brueckner und Cramer, 2008, Kaplan *et al.*, 2008]. Die Konformationen werden als 'open', 'closed', 'wedged', 'trapped' und 'locked' bezeichnet und gehen mit den verschiedenen Stadien des NAZ (Nukleotid-Additions-Zyklus) sowie des 'backtracking' und der RNA-Abspaltung der Polymerase einher.

Die Beobachtungen der unterschiedlichen Konformationen der mobilen Elemente des aktiven Zentrums begründen das heute gängige Modell des NAZ, welcher in Abb. 2.4 dargestellt ist. In der Phase der Posttranslokation ist die Insertionsstelle der RNAP unbesetzt und der Trigger Loop liegt in geöffneter Konformation vor (vgl. Abb. 2.4). Befindet sich ein passendes RNA-Nukleotid im katalytischen Zentrum, bindet dies zunächst in einer vorgeschalteten Insertionsstelle, bevor es

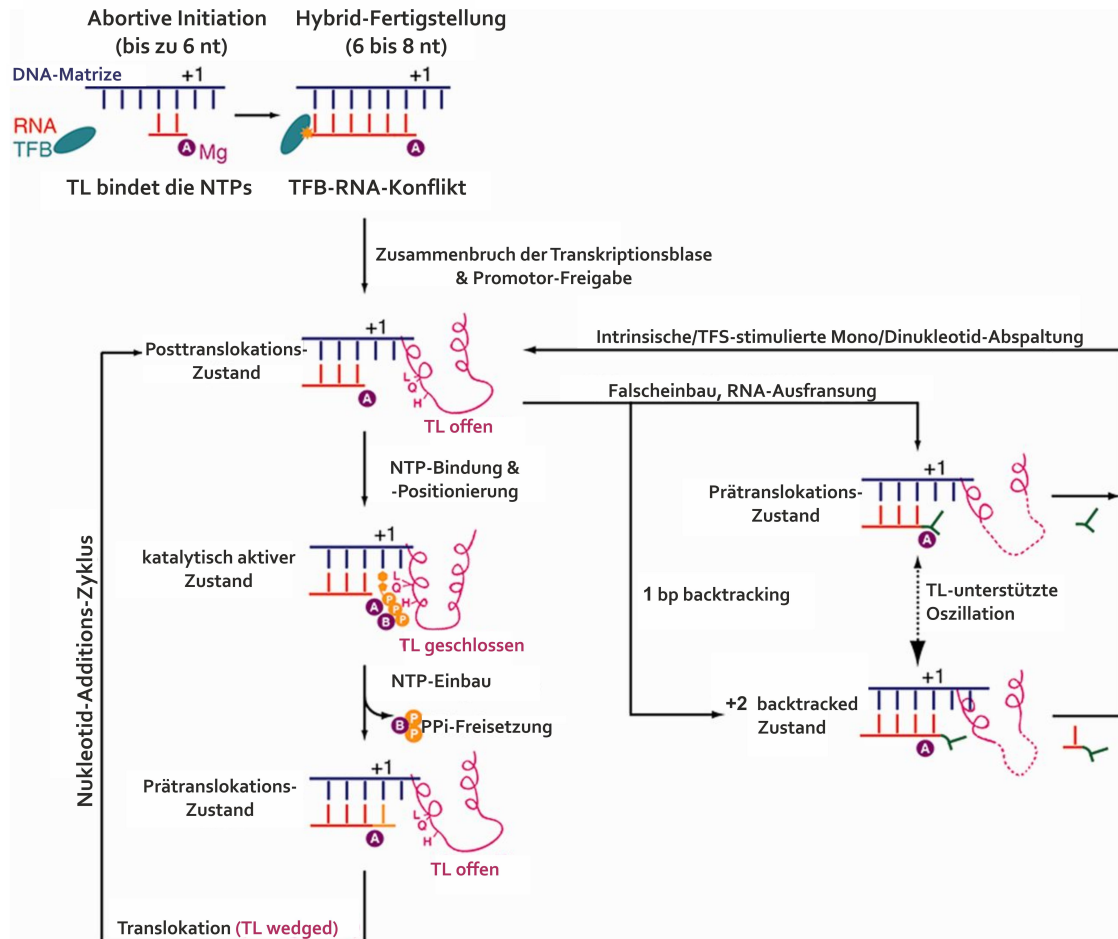


Abbildung 2.4.: **Schematische Darstellung der Trigger Loop Dynamik in bestimmten Phasen der Transkription.** Der TL ist für die initiale RNA-Synthese, bis ein 8 nt-langes DNA-RNA-Hybrid gebildet wurde, essentiell. Während der Elongationsphase ist dieser wichtig für die Transkriptionsgenauigkeit und den Katalyse-Prozess. L83 und H87 sind an der Erkennung des richtigen NTPs beteiligt. Bei Fehleinbauten beeinflusst der TL die Translokation, ist jedoch nicht an der intrinsischen, faktorstimulierten RNA-Abspaltung beteiligt. Solide magenta-farbige Strukturen stehen für die unbeweglichen Teile, die gestrichelte Linie für die flexiblen Abschnitte des Trigger Loops. Abbildung modifiziert nach Fouqueau [Fouqueau *et al.*, 2013].

in die Initiationsstelle gebracht wird. Dies geht einher mit dem Wechsel des Trigger Loops in die geschlossene Konformation, wodurch das aktive Zentrum der RNAP verschlossen wird und die RNAP nun im katalytisch aktiven Stadium vorliegt (vgl. Abb. 2.4). Verschiedene Aminosäurereste des Trigger Loops bilden in der Folge ein Interaktionsnetzwerk mit der Base, dem Zuckerrest und den Phosphatgruppen des NTPs aus. Besonders der Kontakt des TL über die Reste L83 und H87 in RpoA" (entspricht L1081 und H1085 in Rpb1) sind für die Diskriminierung der Nukleotide entscheidend [Kaplan *et al.*, 2008, Yuzenkova *et al.*, 2010]. Der konservierte Histidinrest (H1085 in der eukaryotischen RNAP II, H87 in *P. furiosus*) katalysiert daraufhin die Knüpfung der Phosphodiesesterbindung [Wang *et al.*, 2006]. Die Freisetzung des Pyrophosphats (PPi) nach Inkorporation des Nukleotides in die RNA unterbricht den Kontakt zwischen der RNA und dem Histidinrest des Trigger Loops. Dieser bewegt sich in die offene Konformation, die Bridge Helix wird nach oben geknickt und der kodierende DNA-Strang dadurch ein Stück weiterbewegt. Im Zwischenschritt von Prä- zu Posttranslokation nimmt der Trigger Loop die 'wedged' Konformation ein (vgl. Abb. 2.4). Der Übergang des Trigger Loops in die geöffnete Form und die einhergehende Entspannung der Bridge Helix in die gerade Konformation vervollständigen die DNA-Bewegung um eine Position, so dass die nächste zu komplementierende DNA-Base in der Insertionsstelle zugänglich wird [Brueckner *et al.*, 2009]. Eine Reihe an Untersuchungen der bakteriellen und eukaryotischen Enzyme zeigen, dass die RNAP nach Inkorporation des Nukleotides zwischen Prä- und Posttranslokation oszilliert, bis das nächste NTP die Insertionsstelle erreicht [Landick, 2004, Bar-Nahum *et al.*, 2005]. Die als 'backtracking' bezeichneten Rückwärtsbewegung der RNAP entlang der DNA und RNA geht einher mit der 'trapped' Konformation des TL (vgl. Abb. 2.4). Zuletzt wird während der durch TFS (bzw. TFIS) stimulierten Abspaltung des Transkripts der TL durch TFS aus dem aktiven Zentrum verdrängt und nimmt dabei die 'locked' Position ein.

Kürzlich wurden mit Hilfe des Systems zur Rekonstitution der archaellen RNAP weitere, neben den bisher beschriebenen, Funktionen des TL bei der Transkriptsynthese, während der Initiation und Termination, aufgezeigt [Fouqueau *et al.*, 2013]. Die Katalysefähigkeit von RNAP-Komplexen während der Transkriptionsinitiation hängt entscheidend von der Stimulation durch den TL ab. Demnach scheinen die Wechselwirkungen des TL mit den NTPs während der initialen Transkription, in welcher noch kein stabiles DNA-RNA-Hybrid vorhanden ist, essentiell zu sein. Zudem konnte die These bestätigt werden, dass RpoA" H87 wichtig für die Diskriminierung der NTPs ist. Zuletzt fördert der TL die Prozessivität der RNAP auch indem er vorzeitige Abbrüche der Transkription verhindert.

2.1.3. Zielsetzung

Nach der Entwicklung einer Transformationsmethode und einer Antibiotika-Resistenz basierten Selektions-Strategie für *P. furiosus* sollte das Shuttle-Vektor-System zur Expression von rekombinanten Proteinen in *P. furiosus* weiter etabliert werden. Zu diesem Zweck sollte überprüft werden, inwieweit mutierte Untereinheiten, wie etwa modifizierte Versionen der RpoA", in *P. furiosus* produziert werden können. RNAPs mit Defekten in funktionell wichtigen Regionen dieser Untereinheiten sollen anschließend isoliert und analog der Studien zu *T. kodakarensis* in Struktur-Funktions-Analysen eingesetzt werden [Hirata *et al.*, 2008a, Santangelo *et al.*, 2008b]. Vorversuche,

entsprechende Mutanten der RNAP in Hefestämmen zu generieren, führten in Abhängigkeit zur Art der Modifikation zu schweren Wachstumsdefekten bzw. erwiesen sich als letal [Kaplan *et al.*, 2008]. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich, neben der im Chromosom enthaltenen Genkopie eine veränderte RNAP Sequenz eingeführt. Neben dem normalen Niveau an wt RNAP, die für die Vitalität der Zellen essentiell ist, sollten so zusätzlich veränderte Untereinheiten generiert werden, die zu defekten RNAP-Komplexen assemblieren. Für Struktur-Funktions-Analysen von Mutanten der RNAP von *P. furiosus* war bisher ein System zur Rekonstitution der RNAP-Komplexe aus einzelnen, rekombinanten Untereinheiten genutzt worden [Naji *et al.*, 2007]. Bei diesem Verfahren ist eine anschließende Reinigung der Enzymkomplexe notwendig, um die korrekt assemblierten RNAPs von großen Aggregaten an Untereinheiten oder unvollständig assemblierten Enzymen zu trennen. Die spezifische Aktivität von rekonstituierten wt RNAPs wurde als 50 % der Aktivität der endogenen RNAP aus *P. furiosus* bestimmt [Naji, 2007]. Durch die Etablierung eines Shuttle-Vektor-Systems zur Produktion von mutierten und Hexahistidin fusionierten Proteinen, sollte die Prozedur zur Bereitstellung von *P. furiosus* RNAP-Mutanten für Struktur-Funktions-Analysen vereinfacht und effizienter werden.

2.2. Materialien und Methoden

Alle verwendeten Materialien und Methoden sind im Kapitel 'Standard Methoden und Materialien' (Anhang 1.1) gelistet. Die erzeugten Plasmide und Mutanten wurden in die Klonbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Regensburg aufgenommen. Die durch DNA-Sequenzierung verifizierten Nukleotidabfolgen der erzeugten Plasmide und Mutanten wurden digital am Lehrstuhl für Mikrobiologie hinterlegt.

2.2.1. Bakterien- und Archaeenstämmen

Stamm	Klonnummer	Merkmal/Hersteller
<i>Pyrococcus furiosus</i> pYS3	MURPf3	pYS3
<i>Pyrococcus furiosus</i> pYS7	MURPf21	pYS7 (Stefan Dextl)
<i>Pyrococcus furiosus</i> pYS7 H87P	MURPf40	pYS7 H87P
<i>Pyrococcus furiosus</i> pYS7 ΔTip	MURPf41	pYS7 ΔTip
<i>E. coli</i> BL21 Star		Novagen
<i>E. coli</i> BL21 Star pET30b-PF0739	MUR98E1	pET30b-PF0739 (Dominik Strobel)

2.2.2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Klonnummer	Merkmal/Hersteller
pYS3	pMUR27	<i>P. furiosus</i> Shuttle-Vektor
pYS7	pMUR46	extrachromosomale RpoA"-Kopie (Stefan Dexl)
pYS7 H87P	pMUR64	extrachromosomale RpoA"-Kopie mit Aminosäureaustausch H87P (Martina Knörschild)
pYS7 ΔTip	pMUR66	extrachromosomale RpoA"-Kopie mit Deletion der Tip-Region des Trigger Loops (Martina Knörschild)
pUC19 <i>gdh</i> -C20	pMUR8	<i>gdh</i> -C20 DNA-Kassette (Patrizia Spitalny)
pET30b	pMUR55	<i>E. coli</i> Expressionsvektor (Bernd Goede)
pET30b-PF0739	pMUR296	Expression von PF0739 in <i>E. coli</i> (Dominik Strobel)

2.2.3. pYS7 und dessen Derivate pYS7 H87P und pYS7 ΔTip

Um eine zweite Genkopie der RNAP-Untereinheit RpoA" stabil in *P. furiosus* zu integrieren, wurde der Shuttle-Vektor pYS3 als Träger verwendet. Wie bereits beschrieben, soll die Produktion der zusätzlichen Polymerase-Untereinheit durch die Wahl des *pf0613* Promotors in Abhängigkeit des Substrats reguliert werden. Die einzelnen Fragmente des Konstruktes, der Promotorbereich von *pf0613*, der RpoA" (*pf1562*) Genbereich und der Terminationsbereich des Histon A1 (*pf1831*) wurden durch PCRs aus genomischer DNA von *P. furiosus* amplifiziert und anschließend mittels Überhang-PCRs fusioniert. Dabei wurden an den Enden des Konstrukts zugleich Restriktionschnittstellen für *EcoRV* angefügt. Das fusionierte Gesamtfragment wurde mit *EcoRV* verdaut und über die entsprechende Schnittstelle in den pYS3 Shuttle-Vektor integriert. Der finale Vektor pYS7 ist in Abb. 2.5 schematisch dargestellt [Dexl, 2010]. Der Vektor wurde in *E. coli* DH5α transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden über Kolonie-PCR selektiert und ein positiv getesteter Klon zur Plasmid-Isolierung genutzt. Durch DNA-Sequenzierung wurde der Aufbau von pYS7 verifiziert und die Orientierung des Fragments im Shuttle-Vektor untersucht.

Der erstellte pYS7-Vektor wurde im Anschluss verwendet, um die Substitution des Histidins an Position 87 (pYS7 H87P) der exprimierten RpoA"-Untereinheit durch Prolin zu bewirken und die Deletion der Tip-Region des Trigger Loops (pYS7 ΔTip) zu erzeugen [Knörschild, 2011]. Das Ausgangsplasmid pYS7 wurde in PCR-Ansätzen mit den Primerpaaren H87A-forward-II mit H87A-reversed-II und RpoA"-TL-F mit A-H87A-R eingesetzt. Die hierfür eingesetzten Primer waren durch Phosphatreste an den 5'-Enden modifiziert. Abb. 2.6 gibt einen Überblick der veränderten Genabschnitte. Zur Entfernung des pYS7 Ausgangsplasmids wurden die gereinigten PCR-Produkte mit *DpnI* verdaut und die Plasmid-DNA danach durch Ligation rezirkularisiert. Die fertig gestellten Vektoren wurde in *E. coli* β10-Zellen transformiert und erhaltene Kolonien mit Kolonie-PCR selektiert. Positiv getestete Kolonien wurde zur Plasmid-Isolierung verwendet und anschließend die Richtigkeit der erzeugten Vektoren über Restriktionshydrolyse mit *PvuII* und Sequenzierungen verifiziert (Daten nicht gezeigt).

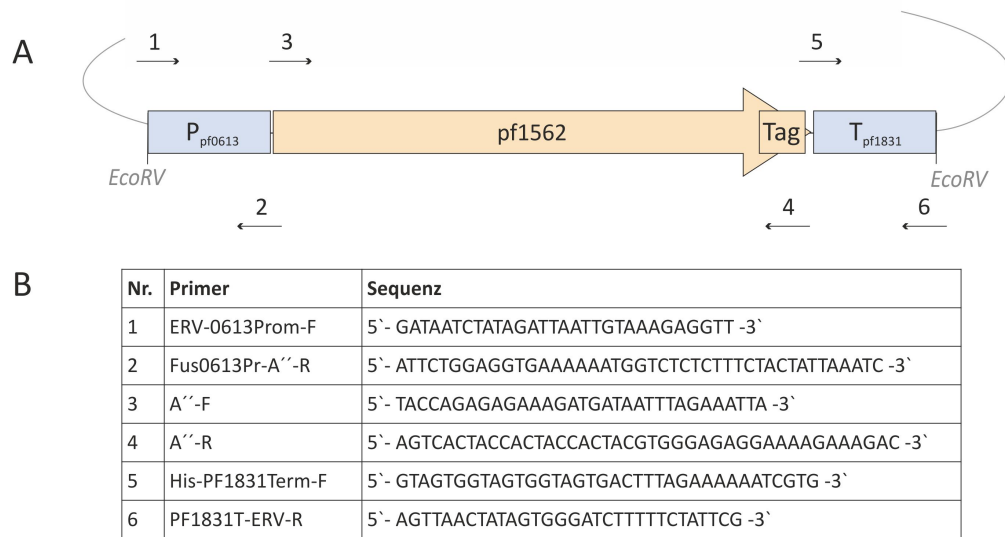


Abbildung 2.5.: **pYS7**. Konstruktion des Plasmids pYS7 (pMUR46). A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung) und Restriktionsschnittstellen. Kodierende Genbereiche sind als hellroter Pfeil, Proteintags als hellrotes Rechteck dargestellt. Regulatorische Sequenzen (Promotor und Terminator) sind als hellblaue Rechtecke abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

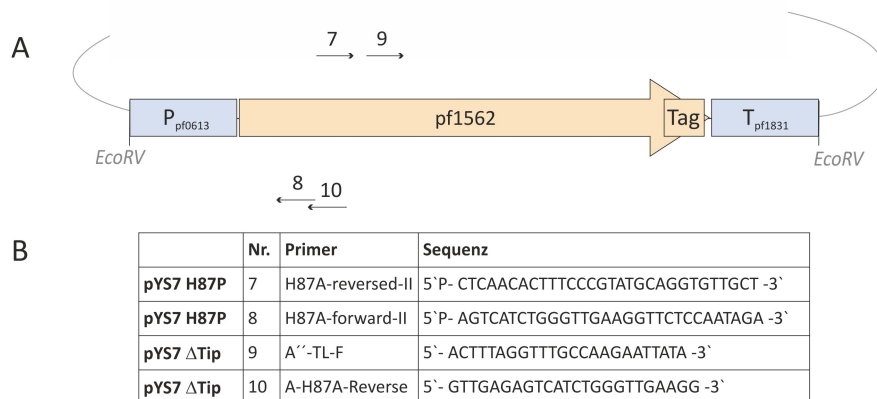


Abbildung 2.6.: **pYS7 Derivate**. Konstruktion der Plasmide pMUR64 und pMUR66. A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung) und Restriktionsschnittstellen. Kodierende Genbereiche sind als hellroter Pfeil, Proteintags als hellrotes Rechteck dargestellt. Regulatorische Sequenzen (Promotor und Terminator) sind als hellblaue Rechtecke abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

Wie bereits beschrieben [Waage *et al.*, 2010]), wurden die Shuttle-Vektoren pMUR46, pMUR64 und pMUR66 durch Hitzeschock in *P. furiosus* transformiert. Durch 40-stündige Inkubation in Flüssigmedium mit 10 μ M Simvastatin wurde auf positive Transformanten selektiert. Anschließend wurden die Zellen auf Gelrite-Vollmedium-Platten mit 10 μ M Simvastatin vereinzelt. Aus angefertigten Reinkulturen von MURPf21, MURPf40 und MURPf41 wurde die gesamte DNA der Zellen isoliert, mittels PCR das Vorhandensein der Expressionsvektoren überprüft und die Shuttle-Vektoren über Sequenzierungen verifiziert.

2.2.4. Electrophoretic mobility shift assay

Präinitiationskomplexe

Mit diesem Ansatz wurde untersucht, ob die RNAP-Mutanten in Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren an die Promotor-DNA rekrutieren. Hierzu wurde eine Cy5-markierte *gdh*-C20-Kassette als Matrize verwendet, welche durch Amplifikation des modifizierten *gdh* Gens mittels PCR generiert. Dafür diente aus *E. coli* JM109 gereinigtes Plasmid pUC19/*gdh*-C20 (pMUR8) [Spitalny und Thomm, 2003] mit 10 ng pro PCR-Ansatz als DNA-Matrize. Des Weiteren enthielten die Ansätze jeweils 0,5 μ M M13F- und 0,5 μ M M13R-Primer, wobei der M13R-Primer des Primerpaars 5'-Cy5-modifiziert war. Die dNTP-Konzentration betrug 100 μ M pro dNTP und die Pufferbedingungen und PCR-Programme entsprachen den empfohlenen Bedingungen der jeweils verwendeten DNA-Polymerasen. Die EMSA-Ansätze enthielten, wie angegeben, 40 nM, 53 nM und 66 nM der RNAPs RpoA", RpoA" H87P, RpoA" Δ Tip oder RpoD RNAP. Dazu kamen 95 nM TBP, 60 nM TFB, 50 nM *gdh*-Promotor-DNA und als unspezifischer Kompetitor etwa 0,2 U Heparin. Die Protein-DNA-Komplexe wurden in 25 μ l Gesamtvolumen unter den Bedingungen des unten beschriebenen EMSA-Puffers assembliert. Die DNA wurde 5 Minuten bei 70 °C mit den Transkriptionsfaktoren vorinkubiert. Dann wurden die RNAPs und anschließend das Heparin zugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert. Die DNA-Protein-Komplexe wurden auf einem 6%igem nativen Polyacrylamidgel analysiert (Laufpuffer: 1x TBE, 4 % Glycerol). Nach einer Elektrophorese bei 200 V (ca. 40 °C) erfolgte die Auswertung über die Fluoreszenz markierten DNA Fragmente am Imager (FLA-5000, Fuji, Japan).

PA-Gel 6 %: H₂O 13,4 ml, 10x-TBE 2 ml, Rotiphorese Gel 30 4 ml, Glycerin 0,4 ml, APS (10 %) 0,2 ml, TEMED 20 μ l

EMSA-Puffer: Na-HEPES, pH 7,5 40 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1 mg/ml, Glycerol 8% (v/v)

2.2.5. Kaliumpermanganat-Footprinting

Immobilisierung von *gdh*-C-Kassetten für KMnO₄-Footprinting-Experimente

Für KMnO₄-Footprinting-Experimente wurden immobilisierte DNA-Matrizen verwendet. Diese werden über eine 5'-Biotin-Modifizierung an Streptavidin-ummantelte Magnetpartikel (MP; Roche) gebunden. Streptavidin ist ein Protein, welches aus vier identischen Untereinheiten aufge-

baut ist, die jeweils Biotin binden. Diese Kopplung ermöglicht die Isolierung von Transkriptionskomplexen und eine vollständige Änderung von Pufferbedingungen in nur einem Schritt. Die *gdh*-C20-Kassette wurde durch Amplifikation der *gdh*-C20-Sequenz von pMUR8 aus *E. coli* JM109 [Spitalny und Thomm, 2003] mittels PCR gewonnen. Neben 10 ng der DNA-Matrize wurden pro PCR-Ansatz jeweils 100 μ M jedes dNTPs, 0,5 μ M M13F und 0,5 μ M M13R-Primer eingesetzt, wobei der M13R Primer des Primerpaars 5'-Biotin modifiziert war. Die Pufferbedingungen und PCR-Programme entsprachen den empfohlenen Bedingungen der jeweils verwendeten DNA-Polymerasen. Für die Bindung wurden 0,5 mg (entspricht 50 μ l) der MP mit 90 μ l Waschpuffer A gemischt, die MP mittels eines Magnetpartikelseparators (MPS; Dynal) isoliert und der Überstand abgenommen. Der Waschvorgang der Partikel wurde insgesamt dreimal durchgeführt, wobei nach dem dritten Waschschrift das MP-Pellet in 90 μ l Bindepuffer und 50 μ l PCR-Produkt aufgenommen wurde. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei RT im Rotamix (ELMI Rotamix RM1) mit anschließender Separierung der MP und Abnahme des Überstandes. Das Pellet wurde in 90 μ l Bindepuffer und weiteren 50 μ l PCR-Produkt aufgenommen und wiederum geschüttelt. Nach weiteren 30 Minuten wurden die MP isoliert und in 90 μ l Waschpuffer B aufgenommen. Nach 1 min Inkubation bei RT wurden die MP mit 90 μ l Waschpuffer B gewaschen und endgültig in 100 μ l EB (Qiagen, Hilden) aufgenommen. Die immobilisierten DNA-Matrizen konnten bei 4 °C für mehrere Monate gelagert werden. Aufgrund der Bindekapazität und einer Kontrolle der Sättigung der MP nach dem letzten Bindschritt auf einem Agarosegel konnte eine DNA-Konzentration von ca. 50 fmol/ μ l vorausgesetzt werden.

Waschpuffer A: Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM

Bindepuffer: Tris-HCl pH 7,5 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM

Waschpuffer B: Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M

Radioaktive Markierung der immobilisierten *gdh*-C20-Kassette für KMnO₄-Footprinting-Experimente

Für KMnO₄-Footprinting-Versuche dienten immobilisierte *gdh*-C20 Kassetten als DNA-Matrize, die am freien 5'-Ende des kodierenden Strangs mit [γ -³²P]-ATP durch PNK radioaktiv markiert wurde. Dafür wurden ungefähr 1,6 pmol immobilisierte DNA-Matrize mit 40 U PNK und 1,11 MBq [γ -³²P]-ATP (220 TBq/mmol) in PNK-Puffer bei 37 °C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die DNA-Matrize separiert und der Überstand abgenommen. Die Partikel wurden mit 50 μ l H₂O gewaschen und in einem Volumen von 25 μ l H₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration betrug etwa 64 fmol/ μ l.

Herstellung von Sequenzstandards für KMnO₄-Footprinting

Um die durch KMnO₄-Footprinting gewonnenen Daten zu analysieren, wurde ein Standard in Form von radioaktiv markierten Sequenzleitern der DNA-Matrizensequenz unter zur Hilfenahme des Jena Bioscience DNA Cycle Sequencing Kits (Jena Bioscience, Jena) hergestellt. Bei der Sequenzreaktion wird die Technik des Cycle Sequencing in Verbindung mit einer thermostabilen Taq-DNA-

Polymerase verwendet, bei der durch den Einbau von Didesoxynukleotiden sequenzspezifische Kettenabbrüche erzeugt werden [Sanger *et al.*, 1977]. Als Matrize diente das Plasmid pMUR8. Als Primer wurde das Oligonukleotid M13R [^{32}P]-markiert. Der Markierungsansatz enthielt 1 μM des entsprechenden Oligonukleotids, 10 Units (U) T4 PNK, 0,46 MBq [γ - ^{32}P]-ATP (220 TBq/mmol) in 10 μl PNK-Reaktionspuffer. Die Reaktion erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C mit anschließender Hitzedenaturierung. Zum Herstellen der Sequenzleitern wurde eine Stammlösung angesetzt, die 2,5 μl des markierten Oligonukleotids, 400 ng des pUC19/*gdh*-C20-Plasmids, 2 U der Rea-derTM Taq-Polymerase in 30 μl 1,3x PCR-Puffer enthielt. Jeweils 12 μl dieser Stammlösung wurden zu 4 μl vorgelegtem ddATP und ddTTP-Terminations-Mix gegeben und eine Sequenzreaktion nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Formamid-Auftragspuffer mit anschließender Hitzedenaturierung gestoppt.

Auftragspuffer: Formamid 98 %, Bromphenolblau 0,1 %, Xylencyanol 0,1%, EDTA pH 8,0 10 nM

Kaliumpermanganat Footprinting von Initiationskomplexen

In diesen Versuchen wurde die Fähigkeit der RNAP untersucht, nach Rekrutierung an die Promotor-DNA, einen offenen Komplex zu bilden. Die Thymidine im offenen Komplex wurden über Behandlung mit KMnO_4 nachgewiesen [Grünberg *et al.*, 2007]. Die Positionen der reaktiven Thymidine wurden über einen Sequenzierstandard mit einem radioaktiv markierten Primer in Gegenwart von ddTTP oder ddATP bestimmt. Die Footprinting-Reaktionen wurden mit je 63 nM der RNAPs, RpoA", RpoA" H87P oder RpoA" ΔTip durchgeführt. 240 nM TBP und 160 nM TFB komplettierten die Ansätze in 25 μl Footprinting-Puffer ohne NTPs. 168 fmol der markierten *gdh*-C20-Kassette dienten als DNA-Matrize. Die Proteine wurden zusammen mit der präparierten, immobilisierten und radioaktiv markierten *gdh*-C20-Kassetten 5 Minuten bei 70 °C vorinkubiert. Anschließend wurde KMnO_4 mit einer Endkonzentration von 23 nM dazu gegeben und die Ansätze weiter bei 70 °C inkubiert. Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von β -Mercaptoethanol auf eine Endkonzentration von 6 % und von 20 μl (auf 70 °C vorgewärmten) KMnO_4 -Stoppuffer. Anschließend wurden die Komplexe isoliert, der Überstand verworfen, die Pellets in 18 μl H_2O und 2 μl 100 % Piperidin aufgenommen und bei 90 °C für 30 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde nach Separation der Magnetpartikel in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegten 30 μl H_2O überführt, gefolgt von einer Ethanolpräzipitation. Die Resuspension der Pellets erfolgte mit 10 μl H_2O . Anschließend wurden die Ansätze mit Formamid-Auftragspuffer versetzt und hitzedenaturiert. Die Analyse der Reaktionen erfolgte auf einem 6%igen bzw. 8%igen PA-Harnstoff-Sequenzgel (Sequi-Gen GT, Bio-Rad, USA).

Footprinting-Puffer: Na-HEPES, pH 7,5 40 mM, EDTA 0,1 mM, NaCl 125 mM, MgCl_2 0,5 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1 mg/ml

KMnO_4 -Stoppuffer: EDTA pH 8,0 125 mM, SDS 1,25 %

Auftragspuffer: Formamid 98 %, Bromphenolblau 0,1 %, Xylencyanol 0,1%, EDTA pH 8,0 10 nM

2.2.6. DNase-Footprinting

Herstellung der DNA-Sonden für DNase-Footprints

Für die Herstellung der DNA-Sonde wurde die Promotorregion der Zielgene zunächst in einer PCR mit den unmarkierten Oligonukleotiden PF0739 TSS1-R und PF0740+5-R amplifiziert, wodurch ein 153 bp umfassendes DNA-Fragment angereichert wird, das die Promotorelemente der Gene *pf0739* und *pf0740* beinhaltet. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und als Template für eine PCR eingesetzt, bei der eines der Oligonukleotide am 5'-Ende eine HEX-Markierung trug. Die vorgeschaltete Amplifikation eines unmarkierten PCR-Produktes diente dabei der Optimierung der Ausbeute an markierten Fragment im zweiten Schritt. Durch die Kombination des Primerpaars PF0739 TSS1-R mit PF0740+5HEX-R entsteht dabei ein Fragment mit markiertem *pf0740*-Matrizen-Strang, durch PF0740+5-R und PF0739 TSS1-RHEX entsprechend dasselbe Fragment mit der Fluoreszenz-Markierung am *pf074*-Matrizen-Strang. Die HEX-markierten PCR-Produkte wurden aufgereinigt und anschließend die Konzentration der Sonden am Nanodrop bestimmt.

Herstellung der PF0739/PF0740-DNA-Sonden

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
11	PF0739 TSS1-R	5'- CATCTAACTGGTCATTCCAACA -3'
12	PF0740+5-R	5'- GAGTGATCTTCACTTTCGTCAC -3'
13	PF0739 TSS1-RHEX	5'-HEX- CATCTAACTGGTCATTCCAACA -3'
14	PF0740+5HEX-R	5'-HEX- GAGTGATCTTCACTTTCGTCAC -3'

Herstellung von Sequenzleitern der DNase-Footprinting DNA-Matrizen

Für die Zuordnung der Footprints wurden Sequenzleitern der untersuchten DNA-Stränge angefertigt, die bei der Sequenzierung mit aufgetragen wurden. Die Sequenzierleiter wurde mit Hilfe des Jena Bioscience DNA Cycle Sequencing Kits erstellt. Zusätzlich wurde ein eigener Stopp-Mix angefertigt. Die Herstellung der Sequenzierstandards erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für jede Base wurde ein Terminations-Ansatz mit dem entsprechenden ddNTP angefertigt. Von jedem Terminationsansatz wurde später 1 µl aufs Gel aufgetragen.

Stopp-Mix: Formamid 95%, EDTA 20 mM,

DNase-Footprinting [Galas und Schmitz, 1978]

Zur Identifizierung der Bindungsstellen des Transkriptionsregulators PF0739 im Promotorbereich der *pf0739*- und *pf0740*-Gene wurden DNase I-Footprintanalysen durchgeführt, wobei der vor dem Abbau durch DNase I geschützte Bereich der DNA-Sonden die Bindungsstelle des Proteins anzeigt. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat in den ungeschützten Bereichen der DNA kann durch

DNase I hydrolysiert werden, wobei die tatsächliche Effizienz der Hydrolyse von der Basenzusammensetzung der DNA abhängt. Bei der anschließenden Elektrophorese wandern die Fragmente entsprechend ihrer Größe im Gel. An den Positionen der DNA, die durch das Protein vor der Hydrolyse geschützt sind, werden dabei im Vergleich zur reinen DNA, Lücken im Fragmentmuster sichtbar, die Footprints des Proteins. DNA und DNase-Konzentrationen der Ansätze müssen hierfür auf single-Hit-Bedingungen eingestellt werden. Die *pf0739/pf0740*-DNA-Sonden (je 4,4 nM) wurden mit dem DNA-bindenden Protein PF0739 (2,4 μ M) und/oder den GTFs TBP (1,0 μ M) und TFB (0,8 μ M) für 20 Minuten bei 70 °C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 15 μ l, die Reaktionsbedingungen sind in dem unten beschriebenen DNase-Footprinting-Puffer wiedergegeben. Als Referenz wurde von jeder DNA-Sonde auch ein entsprechender Ansatz ohne zugesetztes Protein hergestellt, mit dem ansonsten identisch verfahren wurde. Im Anschluss wurden die Reaktionen mit je 0,05 U DNase I versetzt und für eine Minute bei 70 °C inkubiert. Schließlich wurden die Reaktionen mit 5 μ l 95 % Formamid gestoppt, 3 Minuten bei 95 °C inkubiert und danach einer Ethanol-fällung unterzogen (Anhang 1.1). Die Präzipitate wurden in 2-4 μ l Auftragspuffer gelöst und über ein 4,5%iges Sequenzgel (4,5 % PA-Harnstoff) am ABI-Prism 377 DNA Sequencer analysiert.

PA-Harnstoff-Gel, 4,5 %: 10x-TBE 6 ml, H₂O bidest 13 ml, Harnstoff (für Sequenzierer) 18 g, Rotiphorese Gel 30 7,5 ml, APS (10 %) 300 μ l, TEMED 20 μ l

DNase-Footprinting-Puffer: Na-HEPES pH 7,5 40 mM, MgCl₂ 0,5 mM, NaCl 125 mM, EDTA 0,1 mM, BSA 0,1 mg/ml, DTT 1 mM

Auftragspuffer: Formamid 98%, EDTA, pH 8,0 10 nM

2.2.7. Rohextrakte für Proteom-Analyse

Es wurden je 0,25 g *P. furiosus* Zellpellet in 0,75 ml PBS resuspendiert. Dafür wurden die Pellets durch mehrmalige Aufnahme und Abgabe aus einer 1-ml-Spritze mit Kanülen des Durchmessers 0,90 mm oder 0,60 mm im Puffer gelöst. In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde die Suspension mit etwa 0,5 g Glaspartikel (\varnothing 0,1-0,2 mm) versetzt und die Zellen an der Kugelmühle (FastPrep) lysiert. Dazu wurden die Ansätze viermal für 30 Sekunden mit 6,0 M/s (Moves per second) inkubiert. Zwischen den Behandlungen wurden die Ansätze je 3 Minuten auf Eis inkubiert, um die beim Aufschluss entstehende Reibungswärme zu entziehen. Die Effizienz des Zellaufschlusses wurde mikroskopisch überprüft und die Rohextrakte anschließend durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 18.000 (2,0 ml Reaktionsgefäße, Eppendorf Tischzentrifuge) bis 45.000 g (50 ml Zentrifugenbehälter, SS34 Rotor, Sorvall Zentrifuge) geklärt. Die Überstände wurden mit RNase A (10 μ g/ml) und DNase I (1 U/ml) versetzt und wiederum für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Rohextrakte wurden bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

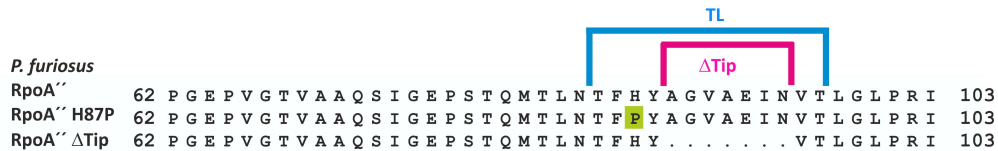


Abbildung 2.7.: Überblick der modifizierten RpoA"-Varianten. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der am TL vorgenommenen Veränderungen. Der Bereich des TL ist durch einen hellblauen Balken, der ΔTip-Bereich durch einen pinken Balken markiert. Die Aminosäure-Substitutionen sind grün hervorgehoben. Fehlende Aminosäuren sind als Punkte gekennzeichnet.

2.3. Ergebnisse

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, inwieweit das Shuttle-Vektor-System geeignet ist, um mutierte RNAP RpoA"-Untereinheiten - mit zum Teil stark eingeschränkter Funktionalität- in *P. furiosus* zu produzieren und diese mit den assemblierten RNAPs zu reinigen. Als Referenz wurde der Shuttle-Vektor pYS7 erzeugt, welcher ein Konstrukt aus dem Promotorbereich von *pf0613*, dem *rpoA*" (*pf1562*) Genbereich mit der Sequenz für einen C-terminalen Hexahistidin-Proteintag und dem Terminationsbereich des *histon a1* (*pf1831*) beinhaltet. Der Vektor pYS7 führt damit in *P. furiosus* zur Produktion der unveränderten wt RpoA"-Untereinheit der RNAP als Histidinfusionsprotein. Durch die Verwendung des *pf0613*-Promotors kann das Expressionsniveau der zusätzlichen Polymerase-Untereinheit in Abhängigkeit des Substrats reguliert werden. Während unter glykolytischen Bedingungen die zusätzliche Untereinheit nur basal transkribiert wird, wird die Expression unter gluconeogenetischen Bedingungen induziert.

Ausgehend von pYS7 wurden Modifikationen in dem Genbereich der RpoA"-Untereinheit eingeführt. Untersuchungen ergaben, dass der Histidinrest an Position 87 des TL bei der RNA-Synthese direkt mit den Nukleotiden interagiert und somit essentiell ist. Wie in Abb. 2.7 dargestellt, wurde eine Mutante (*P. furiosus* pYS7 RpoA" H87P) generiert. Weiterhin wurde eine Mutante erstellt, bei der die gesamte hochmobile Tip-Region des TL entfernt wurde, *P. furiosus* pYS7 RpoA" ΔTip. Unter Berücksichtigung der Erhaltung der Stabilität der Proteinuntereinheit wurden hierfür die Aminosäuren der Positionen 85-97 deletiert (vgl. Abb. 2.7). Im Folgenden wurden sowohl die modifizierten RpoA"-RNAPs als auch die entsprechenden *P. furiosus*-Expressionsstämme untersucht.

2.3.1. Reinigung und Quantifizierung der RNAP-Varianten

Um ausreichend Zellmasse für die Reinigung der RNAPs zu erhalten, wurden mit den *P. furiosus* Stämmen MURPf21, MURPf40 und MURPf41 Großkulturen in 100-Liter-Fermentationsanlagen produziert. Die Kultivierungen fanden auf Flüssigkulturmedium mit den Substraten 0,4 % Pyruvat, 0,1 % Hefeextrakt und 0,1 % Pepton sowie 10 μM Simvastatin bei 85 °C statt (Anhang 1.3).

Reinigung der RNAPs. Aus dem so erhaltenen Zellmaterial wurden für die Proteinreinigungen Rohextrakte hergestellt. Ein detailliertes Protokoll der Erstellung der Rohextrakte für Proteinreinigungen mittels Ni-NTA befindet sich im Kapitel 'Standard-Methoden und Materialien' (Anhang 1.2). Die Reinigung der Fusionsproteine aus den *Pyrococcus*-Zelllysaten fand nach dem be-

Tabelle 2.1.: Ausbeute der Reinigung der RpoA"-RNAPs.

<i>P. furiosus</i> -Stamm	Menge an RNAP pro 1 g verwendetes Zellpellet
RNAP RpoA"	36,5 μ g
RNAP RpoA" H87P	30,8 μ g
RNAP RpoA" Δ Tip	< 8,5 μ g

reits beschriebenen Schema statt (Anhang 1.2). Mit Hilfe des zweistufigen Reinigungsprotokolls, bestehend aus Ni-NTA Affinitäts- und anschließender Gelfiltrations-Chromatographie wurden reine und vollständig assemblierte RNAPs (in beschriebenem RNAP-Puffer) erhalten. Abschließend wurden die Fraktionen an gereinigten RNAPs jeweils vereint, mittels Vivaspin20 angereichert (Sartorius) und nach Konzentrationsbestimmung bei -80 °C gelagert. Die Ausbeuten an gereinigten RNAPs aus den *P. furiosus*-Mutationstämmen ist in Tabelle 2.1 gelistet. Die Ausbeute der RpoA" Δ Tip RNAP-Reinigung ist deutlich geringer als die der RpoA" RNAP mit Hexahistidin-Tag oder der RpoA" H87P RNAP.

SDS-PAGE. Der Reinheitsgrad und die Konstitution der gereinigten RNAPs wurde über Gradienten (10-20 %)-SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Zusätzlich wurde hierbei zum Vergleich die RNAP mit der 6xHistidin-RpoD-Untereinheit hinzugezogen und von allen RNAPs je identische Mengen elektrophoretisch getrennt. Wie in Abbildung 2.8 dargestellt, entsprechen die Proteinbanden der getrennten Untereinheiten der verschiedenen RNAPs. Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität gehen auf die jeweiligen Protein-Tags der modifizierten Untereinheiten RpoD (Spur 4) und RpoA" (Spuren 1 bis 3) zurück, welche eine Verminderung der elektrophoretischen Mobilität der getaggten Untereinheiten bei der Trennung bewirken. Somit war sichergestellt, dass die modifizierten Untereinheiten in *P. furiosus* produziert und korrekt in die RNAP eingebaut werden. In der Spur der gereinigten RpoA" Δ Tip-RNAP sind zwei zusätzliche Proteinbanden mit einer Masse von 25-30 kDa angefärbt, welche vergleichsweise schwach auch bei der RpoA" H87P-RNAP vorhanden sind. Deren Position ist durch einen Pfeil angedeutet (vgl. Abbildung 2.8). Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration der Lösung führen die zusätzlichen Proteine zu einer artifiziellen Erhöhung. Daher liegt die tatsächliche Ausbeute an RpoA" Δ Tip-RNAP unter dem ermittelten Wert von 8,5 μ g. Die massenspektrometrische Analyse der entsprechenden Proteinbanden ergab, dass es sich in beiden Fällen um Versionen des Proteins PF0739 handelt, auf welches im Abschnitt 2.3.4 genauer eingegangen wird.

Western Blot Analyse. Durch Western Blot Analysen der gereinigten RNAPs konnte ausgeschlossen werden, dass die gereinigten RNAPs Anteile an wt RNAP enthalten, welche die Ergebnisse des späteren Aktivitätstests verfälschen würden. Wie in Abb. 2.9 dargestellt, ist die Position der Untereinheit in allen RNAPs mit veränderter RpoA"-Untereinheit (Spuren 1-3) leicht versetzt, wobei bei der RpoA" Δ Tip-Mutante der Unterschied sehr gering ist. Der Größenunter-

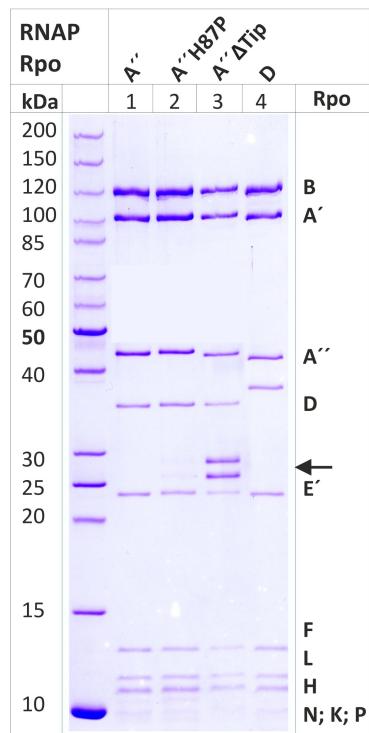


Abbildung 2.8.: SDS-Gel mit den gereinigten RpoA"-RNAPs. In einem SDS-PA (10-20 %)-Gradientengel wurden je 3,0 µg der aus *P. furiosus* gereinigten RNAPs getrennt und Coomassie gefärbt. Zum Vergleich ist eine auf identische Art isolierte RNAP mit Hexahistidin-Tag an RpoD mit auf dem SDS-Gel getrennt worden. Der Pfeil deutet die Position der zusätzlich vorhandenen Proteinbanden der RpoA" ΔTip bzw. RpoA" H87P-RNAP-Reinigung an.

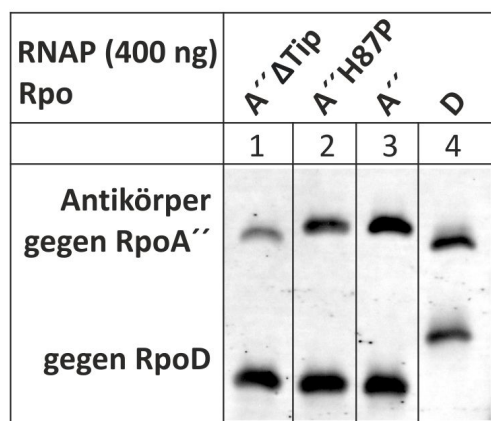


Abbildung 2.9.: Die gereinigten RpoA"-RNAPs sind frei von Kontamination durch wt RNAP. Position der durch die entsprechenden Antikörper detektierten Untereinheiten RpoA'' und RpoD. RpoD-getaggte RNAP wurde zur Kontrolle der Position der wt RpoA"-Untereinheit verwendet.

RNAP	-	-	A''			A''H87P			A'' ΔTip			D		
nM	-	-	40	53	66	40	53	66	40	53	66	40	53	66
TBP/TFB	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TBP/TFB/RNAP														
TBP/TFB														
freie DNA														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

Abbildung 2.10.: **Rekrutierung der mutierten RpoA''-RNAPs an den *gdh*-Promotor.** EMSA mit den RNAPs RpoA'', RpoA'' H87P und RpoA'' ΔTip sowie den GTFs TBP und TFB. Als DNA-Matrize wurde eine Cy5-Fluoreszenz-markierte *gdh*-C20-Kassette der Konzentration 50 nM verwendet. Die RNAPs wurden mit der angegebenen Konzentration zugegeben; die GTFs wurden in einer Konzentration von 95 nM (TBP) und 60 nM (TFB) eingesetzt. Die RpoD-RNAP wurde als Kontrolle verwendet. Eine detaillierte Darstellung der Durchführung ist im Abschnitt 'Materialien und Methoden' 2.2.4 beschrieben.

schied ist durch den Hexahistidin-Tag begründet. Die elektrophoretische Mobilität der wt RpoA''-Untereinheit wird dabei in der Spur der RpoD-RNAP (Spur 4) wiedergegeben. Demnach sind alle gereinigten RNAPs frei von Kontaminationen durch wt RNAP.

2.3.2. Funktionsanalyse der modifizierten RpoA''-RNAPs

EMSA-Analyse. Im Zuge der Untersuchung der Aktivität der gereinigten RNAPs wurden Gel-retardierungs-Ansätze durchgeführt. Durch diese wurde sichergestellt, dass die gereinigten RpoA''-RNAP-Mutanten durch die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB an eine Promotorsequenz rekrutiert werden können. Wie in Abb. 2.10 zu sehen, ist dies für alle getesteten RNAPs der Fall. Im Vergleich zu den wt RpoA''-RNAPs (Spuren 3-5) und RpoD (Spuren 12-14) ist bei den RNAPs mit den Mutationen im TL von RpoA'' (Spuren 6-8 und 9-11) kein Unterschied in der Fähigkeit bei der Bildung der Initiationskomplexe zu beobachten. Das Signal der RpoA'' ΔTip-RNAP-Bindung deutet sogar auf eine intensivere Bindung hin. Dementsprechend kann der erste Schritt der Initiation der Transkription erfolgen.

Kaliumpermanganat-Footprinting. Im Anschluss an die Rekrutierung ist die Bildung eines offenen Komplexes der nächste Schritt der Transkriptionsinitiation. Diese wurde anhand eines Kaliumpermanganat-Footprints untersucht, bei dem die Thymidine im offenen Komplex detektiert werden können (vgl. Abb. 2.11). Die durch die RpoA'' H87P- und RpoA'' ΔTip-RNAPs (Spuren 2 und 3) gebildeten Signale wurden im Vergleich zu RpoA''-RNAP (Spur 1) etwas schwächer detektiert. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass kein erheblicher Defekt in der Fähigkeit zur Open-Complex-Bildung dieser Polymerasen vorliegt.

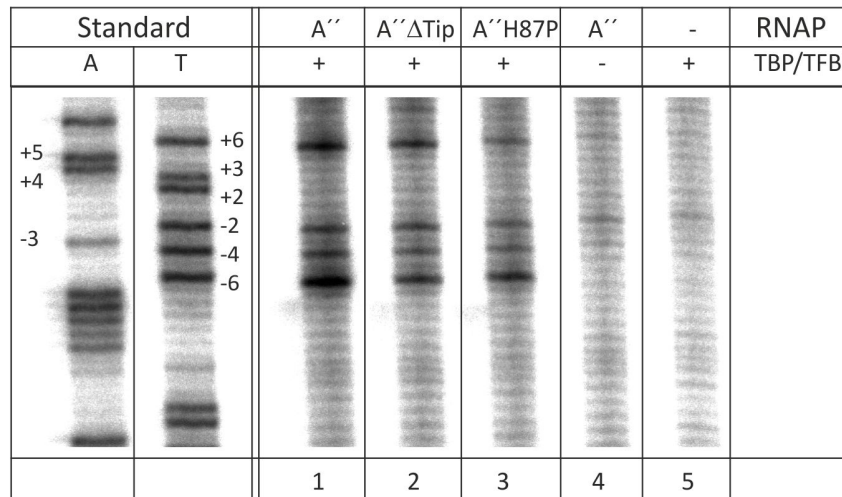


Abbildung 2.11.: **Fähigkeit der mutierten RpoA" RNAPs zur Open-Complex-Bildung.** Es wurde die DNA-Öffnung durch die verschiedenen RNAPs RpoA", RpoA" H87P und RpoA" ΔTip mit Hilfe eines Kaliumpermanganat-Footprints untersucht. Die Zugabe der entsprechenden RNAPs (je 63 nM) und der Transkriptionsfaktoren TBP (240 nM) und TFB (160 nM) ist angegeben. In den Spuren 4 und 5 sind die Negativkontrollen ohne RNAP bzw. Transkriptionsfaktoren zu sehen. Das detaillierte Protokoll ist im Abschnitt 'Materialien und Methoden' 2.2.5 beschrieben

In vitro Transkription. Zur Bestimmung der Funktionalität der gereinigten RNAPs wurden entsprechend dem etablierten Protokoll (Anhang 1.1) promotorabhängige *in vitro* Transkriptionsansätze durchgeführt. Dabei konnte, wie erwartet, ein signifikanter Unterschied der Aktivitäten der RNAPs ermittelt werden. Während das Niveau des Transkripts der RNAP mit der Hexahistidin-getaggtten wt RpoA"-Untereinheit demjenigen der Hexahistidin-getaggtten RpoD-RNAP gleicht (entspricht 100 % Transkriptionsaktivität), liegen die Transkriptionsraten der RNAPs mit den modifizierten RpoA"-Untereinheit darunter. Aus der Quantifizierung des Transkripts und der Berechnung der Aktivitätsrate ergibt sich dabei eine Rest-Aktivität von 4,2 % für die RpoA" H87P-RNAP (Abb. 2.12 Spur 3) und sogar nur von 0,5 % für die RpoA" ΔTip-RNAP (Abb. 2.12 Spur 2). Hierbei wurden alle Ansätze je in dreifacher Ausführung angefertigt und die aus den Quantifizierungen berechneten Mittelwerte für die Bestimmung der Aktivitätsraten verwendet. Bereits durch die Substitution eines einzigen Aminosäurerestes die Funktionalität der RNAP stark vermindert. Die Deletion der gesamten Tip-Region des Trigger Loops führt folglich, wie erwartet, zu einer noch ausgeprägteren Beeinflussung der RNAP bzw. unterbindet die Transkriptionsaktivität der RNAP vollständig.

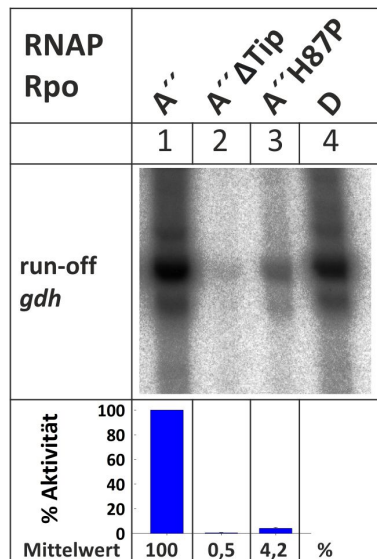


Abbildung 2.12.: Stark verminderte RNA-Syntheseleistung der modifizierten RpoA''-RNAPs bei *in vitro* Transkriptionsexperimenten. Die Produktion eines 248 nt Run-off-Transkripts an einem *gdh*-Promotor wurde auf einem 6%igen PA-Harnstoff-Gel untersucht. Die Transkription erfolgte unter Standardbedingungen mit je 10 nM RNAP, 95 nM TBP, 30 nM TFB und 3 nM *gdh*-Matrize ('Standard Methoden und Materialien' im Anhang 1.1) bei 80 °C für 10 Minuten. Die Spuren 1-3 mit den Transkriptionsaktivitäten der RpoA''-RNAPs, die Spur 4 zeigt als Kontrolle den entsprechenden Ansatz mit der Hexahistidin-getaggtten RpoD-RNAP. Die Quantifizierung wurde mit der Aida Image Analyzer Software durchgeführt. Die Aktivität der unveränderten RpoA''-RNAP wurde 100 % gesetzt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert der Transkriptionsaktivitäten der modifizierten RNAPs relativ zu RpoA''-RNAP.

2.3.3. Analyse der *P. furiosus*-Stämme

Western Blot. Die hohe Varianz der Ausbeute bei der Reinigung der RNAPs aus den verschiedenen *P. furiosus*-Stämmen (vgl. Tabelle 2.1) gab Anlass, die Menge an vorhandenen modifizierten RNAPs in den Stämmen untereinander sowie je mit dem Gehalt an wt RNAP zu vergleichen. Dazu wurden Western Blots (Anhang 1.2) mit entsprechenden Mengen an Rohextrakt der Stämme angefertigt. Gezeigt sind in Abbildung 2.13 die zuvor vermessenen und über die RpoD-Untereinheit normalisierten Rohextrakte der Stämme *P. furiosus* Wildtyp, *P. furiosus* RNAP RpoA'' und *P. furiosus* RNAP RpoA'' H87P. Durch den eingesetzten Antikörper gegen die RpoA''-Untereinheit wurden dabei zugleich die modifizierten Varianten als auch die unveränderte RpoA''-Untereinheit der Rohextrakte markiert. Durch den zusätzlichen Proteintag können die Signale der wt RpoA''-Untereinheit von den mutierten RpoA''-Varianten auf dem Western Blot unterschieden werden.

Es wurden große Unterschiede im Gehalt der modifizierten Untereinheiten in den Stämmen deutlich. Bei den Proben aus *P. furiosus* RNAP RpoA'' (vgl. Abb. 2.13 Spuren 4-6) wurde die Produktion der veränderten Untereinheit im Vergleich zur wt Untereinheit (vgl. Abb. 2.13 Spuren 7-9) induziert, was auf die Verwendung des *pf0613*-Promotors und der Kultivierung der Zellen unter gluconeogenetischen Bedingungen zurückzuführen ist. Hingegen ist bei den *P. furiosus* RNAP RpoA'' H87P-Zellen (vgl. Abb. 2.13 Spuren 1-3) die Menge an vorhandener, modifizierter RpoA''-Untereinheit, trotz analoger Verwendung des *pf0613*-Promotors und gleicher Kultivierungsbedingungen, deutlich reduziert. Der Gehalt der RpoA'' H87P-Untereinheit scheint geringer als derjenige der wt Untereinheit. Eine Analyse des RpoA'' ΔTip-Gehalts in den entsprechenden *P. furiosus*-Zellen war nicht in analoger Weise möglich. Aufgrund der Deletion der Tip-Region ist die Mobilität der Untereinheit bei der Elektrophorese soweit erhöht, dass sie nicht mehr von der wt RpoA''-Untereinheit unterschieden werden kann; ihre molekularen Massen sind zu ähnlich. Da eine Diskriminierung der Untereinheiten auch nicht durch die Verwendung anderen Antikörper möglich war, wurde der *P. furiosus* RpoA'' ΔTip-Stamm nicht für die Analyse des Gehaltes der RpoA'' ΔTip-Untereinheiten über Western Blot hinzu gezogen. In Anbetracht der extrem niedri-

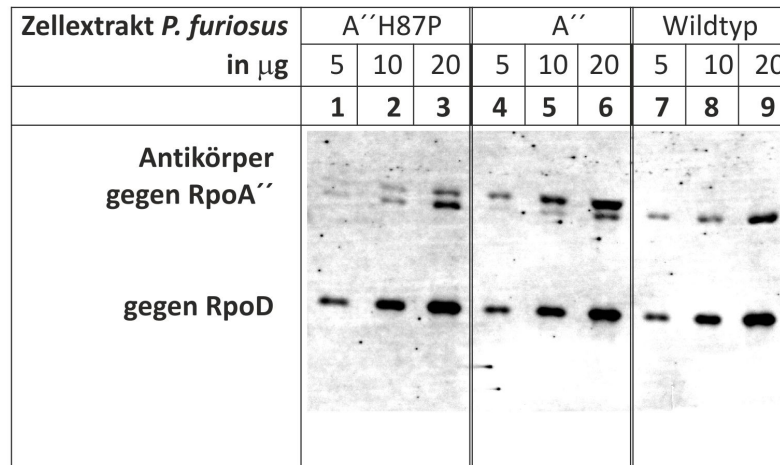


Abbildung 2.13.: **Signifikanter Unterschied des Gehalts an Wildtyp und modifizierter RpoA''-Untereinheit in den *P. furiosus* Stämmen.** Mit Hilfe eines Western Blots (Anhang 1.2) wurden die Zellextrakte der *P. furiosus* Stämme mit den verschiedenen RpoA''-Varianten auf deren Expressionsniveau in Relation zur wt Untereinheit untersucht. Während die endogene RpoA''-Genkopie in einem Operon organisiert ist, werden die zusätzlichen RpoA''-Varianten auf Shuttle-Vektoren durch einen konstitutiv starken Promotor reguliert. Zur Detektion wurden Antikörper gegen die RNAP-Untereinheiten RpoA'', welcher gegen die Wildtyp und modifizierte Untereinheit gerichtet ist, und RpoD verwendet.

gen Ausbeute der entsprechenden RpoA'' ΔTip-RNAP-Reinigung ist jedoch von einem nochmals stark reduzierten Anteil der modifizierten Untereinheit in den Zellen auszugehen, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass in diesem Fall zu wenig Protein für die Detektion über den RpoA''-Antikörper vorhanden ist.

Proteom Analyse. Um einen tieferen Einblick über weiterreichende Veränderungen, u.a. spezifische Proteinabbau-Mechanismen in den *P. furiosus* Stämmen, welche durch die modifizierten RpoA'' Untereinheiten bedingt werden, zu erhalten, wurden deren Rohextrakte analysiert. Dafür wurden jeweils auf Pyruvat-Medium gezogene Zellen verwendet, da durch die substratabhängige Induktion der Expression die Effekte der modifizierten RpoA''-Untereinheit auf die Zellen am stärksten sein sollten. Als Referenz wurden *P. furiosus* pYS3-Zellen eingesetzt, um Unterschiede des Proteinhaushaltes, die durch das Shuttle-Vektor-System verursacht werden, zu eliminieren. In Abb. 2.14 gezeigt sind die Rohextrakte von *P. furiosus* pYS7, pYS7 H87P und pYS3 auf einem 6-20%igen Gradientengel. Proteinbanden, die als deutlich verschieden zwischen den Stämmen bewertet wurden, wurden aus den Gelen isoliert und die Proteine massenspektrometrisch analysiert (AG Prof. Dr. Rainer Deutzmann). Darunter auch jene, die in Abb. 2.14 mit Pfeilen hervorgehoben wurden. Unter den analysierten Proteinen befinden sich neben noch uncharakterisierten Proteinen vornehmlich Peptidasen und Enzyme, die Teil des Energie-Metabolismus der Zelle sind. Ein großes Problem stellt jedoch die ungenügende Reinheit der Proteinbanden durch die begrenzte Separation bei der eindimensionalen Elektrophorese dar. Diese führt zu enormen Hintergrundsignalen bei der MALDI (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations)-Analyse. Es wurden für jede isolierte Proteinbande mehrere Proteine bestimmt. Eine Aussage über den tatsächlichen Anteil ist nicht möglich, da die unterschiedliche Effizienz des Trypsin-Verdaus der Proteine im

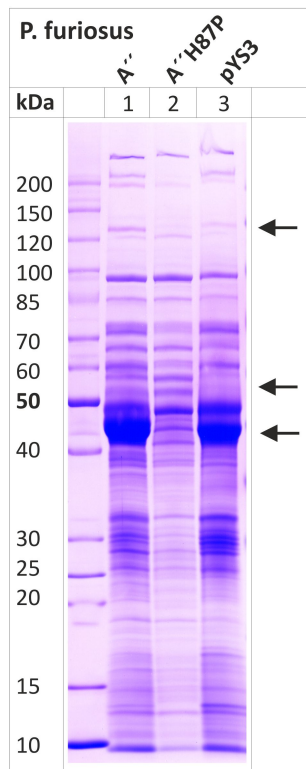


Abbildung 2.14.: **Unterschiede im Proteom der *P. furiosus*-Stämme.** In einem SDS-PAGE (6-20 %)-Gradientengel wurden je identische Volumen analog hergestellter Rohextrakte von *P. furiosus* MURPf21, MURPf40 sowie als Kontrolle MURPf3 aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Die Pfeile deuten auf einige Proteinbanden hin, die zwischen den Stämmen variieren. Diese wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Zuge der Präparation der Proben für die MALDI-Analyse eine Verschiebung der Signale bewirken kann. Selbst bei der Analyse identischer Proteinbanden aus verschiedenen Gelen wurden unterschiedliche Proteine detektiert. Daher erscheint für eine detaillierte Untersuchung der offensichtlichen Varianzen im Proteom der Stämme eine verbesserte Auftrennung der Proteine über 2D-Gelelektrophorese vor der Massenspektrometrie oder die Anwendung eines direkten LC/MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)-Verfahrens sinnvoll.

Wachstumsanalyse. In einem weiteren Versuch wurden Wachstumsanalysen der Stämme *P. furiosus* pYS7, pYS7 H87P und pYS7 Δ Tip durchgeführt. Die Ansätze zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens wurden je zweimal in 20 ml Pyruvat-Flüssigkulturmedium mit 10 μ M Simvastatin analog durchgeführt. Dabei wurden die Kulturen je mit einer Ausgangszelldichte von etwa $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml beimpft und das Wachstum bei 85 °C über 15 Stunden hinweg verfolgt (Daten nicht gezeigt). Da sich weder die Generationszeit noch die maximal erreichte Zelldichte der *P. furiosus*-Mutanten signifikant unterschieden, liegt nahe, dass es in den Zellen einen stringenten Mechanismus gibt, der diese vor den negativen Einflüssen der defekten bzw. vermindert aktiven RNAPs schützt. Obwohl noch keine gefestigten Erkenntnisse über die Art der Adaption gewonnen werden konnten, erhärtet sich unter Einbeziehung der Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abb. 2.13) die These eines effektiven Abbau-Mechanismus der inaktiven RNAPs in den Zellen. Durch eine strikte Reduktion der Anzahl an defekter RNAPs in den Zellen wird daher wahrscheinlich deren Wachstum nicht signifikant verzögert.

2.3.4. PF0739

Bei der Reinigung der RpoA" Δ Tip-RNAP und in geringerem Maße auch bei der RpoA" H87P-RNAP wurde ein weiteres Protein spezifisch gereinigt, welches massenspektrometrisch als das Proteinprodukt des Gens *pf0739* identifiziert wurde (vgl. Abb. 2.8 Spur 2 und 3). Die Co-Purifikation trat in zwei Formen, als Gesamtprotein oder einer trugierten, wahrscheinlich prozessierten Version auf, bei der ein Teil des C-Terminus des Proteins fehlt. PF0739 ist als Transkriptionsregulator der AsnC (Asparagin-Synthase C)-Familie beschrieben und innerhalb der Bacteria und Archaea hoch konserviert. Das Protein besitzt neben einer HTH (Helix-Turn-Helix)-DNA-Bindedomäne einen Weiteren, als TRASH-Domäne bezeichneten Bereich, der als Metallionen-abhängiges Regulatorelement beschrieben ist und in dem eine lockere Folge von fünf Histidinen auftritt. Sequenzvergleiche der Aminosäureabfolge von PF0739 zeigen, dass das Protein innerhalb der *Thermococcales* hoch konserviert ist und die Sequenzidentitäten je über 70 % liegen.

Expression und Reinigung von PF0739. Da PF0739 nur in den Reinigungen der RNAPs mit modifizierter RpoA"-Untereinheit auftrat, sollte in weiteren Untersuchungen der Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor PF0739 und den veränderten RNAPs analysiert werden. Der Faktor PF0739 wurde hierfür rekombinant produziert [Strobel, 2012]. Dabei wurde die Sequenz von *pf0739* aus dem Genom von *P. furiosus* amplifiziert. Über angefügte Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment in einen pET30b-Vektor (Bernd Goede, pMUR55) integriert und in *E. coli* BL21 Star-Zellen (Novagen) transformiert. Mit verifizierten Transformanten wurde PF0739 produziert und nach Hitzefällung der *E. coli*-Proteine (10 min bei 90 °C) sowie deren Trennung durch Zentrifugation säulenchromatographisch gereinigt (Anhang 1.2). Aufgrund der DNA-Bindefähigkeit von PF0739 konnte dieses durch Verwendung einer Heparinsäule affinitäts-chromatographisch und anschließend mittels Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt werden [Strobel, 2012].

In vitro Transkription In einem ersten Versuch sollte der Einfluss von PF0739 auf die Aktivität von wt RNAP und die modifizierte RpoA" Δ Tip-RNAP bestimmt werden. Ziel dabei war es auszuschließen, dass die stark herabgesetzte Transkriptionsaktivität der veränderten RNAPs (vgl. Abb. 2.12) durch die Anwesenheit von PF0739 verursacht wird. Mittels promotorabhängiger *in vitro* Transkriptionen wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors PF0739 auf die Transkriptionsfähigkeit der RNAP RpoA" getestet. Dabei wurde deutlich, dass bei Verwendung des Promotors der *gdh*, selbst bei Zugabe großer Mengen von PF0739, das erzeugte Transkriptlevel annähernd unverändert bleibt (vgl. Abb. 2.16A Spuren 1-5). Daher ist davon auszugehen, dass bei den früheren Analysen keine Verfälschungen der Aktivitätsbestimmung der RpoA"-RNAP-Mutanten durch PF0739 stattgefunden hat, da diese ausschließlich am Promotor der *gdh* durchgeführt wurden.

2.3. Ergebnisse

```
CACATTGCACATGTCATACCACCTATCTTTATCAGCATCCCTGCGCTCCCTTATCACCTCGTAGCCACATCTTCGATGGCTTTGATGATCTGATTTA < 100
GTGTAACGTGTACAGTATGGTGGATAGAAATAGTGTCTAGGACGCGAGGGAATAGTGGAGCATCGGGTGTAGAAGTACCGAACTACTAGACTAAAT
10 20 30 40 50 60 70 80 90

GGCTAACTTTTGACTCATCAAAGTCAACAAAGACGGTCTCATTGTTTAGATTGTCCTTTGCAACTTTAACCCCTCCAATTCAGTTAAAGCCATCTCTAT < 200
CCGATTGAAACTGAGTAGTTTCAGTTGTTTCTGCCAGAGTAACAAATCTAAACGGAAACGTTGAAATTTGGGGAGGTTAAGTCAATTCGGTAGAGATA
110 120 130 140 150 160 170 180 190

GGTTTTAACGCATTTGCACATGTCATACCATTAACTTTAAGAGTGATCTTCACTTTCGTACCAATATTTACTTTGTGACGAACTTAATGGGTATTAT < 300
CCAAAATTCGCGTAACTGTACAGTATGGTAATTGAAATCTCACTAGAAAGTGAAGCAGTGGTTATAATGAAACACTGCTTTGAATTACCATAATA
210 220 230 240 250 260 270 280 290

TCATGCCAAAATGTAAACACTAACCAATGTTTTTATATTTTGGCAACTAATACTCCAGGGAATGGGGGTGTTGGAATGACCAAGTTAGATGATTGG < 400
AGTACGGTTTACATTTGTGATTGGTTTACAAAAATATAAAACCGTTGATTATGAGGGTCCCTTACCCCAACCTTACTGGTTCAATCTACTAAACC
310 320 330 340 350 360 370 380 390

ATCTAAAGCTCATATACCTTTTAAATGGACGATGCAAGGCTAAGTATATCTGAGCTGGCCGATAGGCTCGGAGTTAGCAGACCTACG < 486
TAGATTTCGAGTATATGAAAAATTACCTGCTACGTTCCGATTTCATATAGACTCGACCGGCTATCCGAGCCTCAATCGTCTGGATGC
410 420 430 440 450 460 470 480
```

Abbildung 2.15.: DNA-Matrize mit *pf0739* und *pf0740* Promotorelementen. Die zur Amplifikation der Matrize eingesetzten Oligonukleotidsequenzen sind grün dargestellt. Die bekannten Translationsstartcodons (TLS) sind in rot abgebildet. Eine Längenskala der Sequenz ist gegeben.

In den Spuren 6-10 der Abb. 2.16 A wird das Transkriptionsmuster deutlich, welches durch die Verwendung einer DNA-Matrize entsteht, deren Sequenz die Promotorstrukturen beider Gene, *pf0739* und *pf0740*, umfasst (vgl. Abb. 2.15). Während die Transkriptionsrate am Promotor von *pf0739* sinkt, scheint die Transkriptsynthese am *pf0740*-Promotor aktiviert zu werden (vgl. Abb. 2.16 A Spuren 6-10). Eine detaillierte Analyse der regulatorischen Effekte von PF0739 an der entsprechenden DNA-Matrize zeigt, dass durch erhöhte Zugabe der GTFs TBP und TFB der Effekt von PF0739 irreversibel ist. In Abb. 2.16B sind die Ergebnisse der Versuchsreihe zu sehen. Durch die Zugabe von PF0739 wird die Transkription am *pf0740*-Promotor im Vergleich zum *pf0739*-Produkt deutlich induziert (Abb. 2.16 B Spuren 1-3 und 4-6). Durch gesteigerte Zugabe der GTFs steigt die Gesamt-RNA-Synthese, das Verhältnis zwischen *pf0739*- und *pf0740*-Produkt bleibt pro Versuchsreihe erhalten.

Gelretardierungs-Experimente. Das Bindungsverhalten von PF0739 an der DNA-Matrize mit beiden Promotorelementen für *pf0739* und *pf0740* wurde durch Protein-Bindestudien in Form von Elektro-Mobility-Shift-Assays (EMSA) Gelretardierungs-Experimenten und DNase-Footprints untersucht. Bindet PF0739 an die *pf0739/pf0740*-DNA-Matrize, wie in Abb. 2.17 dargestellt, wird dadurch die Mobilität des DNA-Fragments im EMSA deutlich verzögert (vgl. Spuren 1-5). Der singuläre und relativ große Shift sowie die dafür benötigte Menge an Protein könnte ein Hinweis sein, dass PF0739 tatsächlich nicht als Monomer vorliegt bzw. an die DNA bindet. Durch die Zugabe von TBP und TFB zur DNA-Matrize werden mehrere Komplexe gebildet, was auf die Anzahl und die Besetzung der Proteinbindestellen der beiden Promotorstrukturen zurückzuführen ist (vgl. Spuren 6-12). Weiterhin entstehen durch die Zugabe von PF0739 zu DNA-TFB/TBP-Komplexen zusätzliche Shifts. Neben dem Signal, welches durch die Bindung von PF0739 an die DNA gebildet wird, zeichnet sich hier auch das Signal eines größeren Komplexes ab. Dies deutet auf die Bildung von DNA-TBP/TFB-PF0739 Komplexen hin.

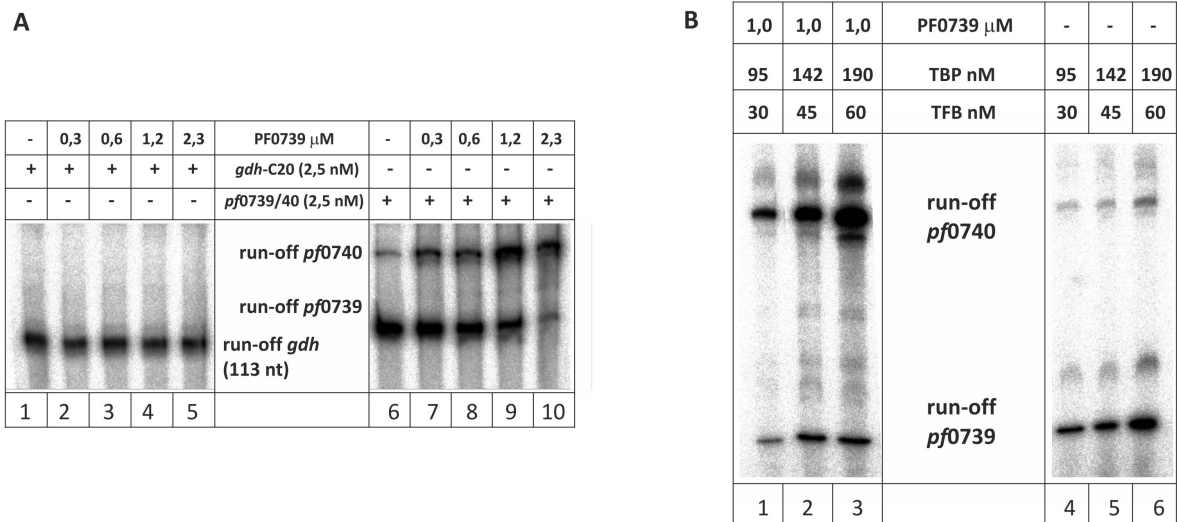


Abbildung 2.16.: Einfluss von PF0739 auf promotorabhängige *in vitro* Transkriptionen. Getestet wurden die *gdh*-C20-Kassette und eine DNA-Matrize, die beide Promotorregionen der Gene *pf0739* und *pf0740* beinhaltet (vgl. Abb. 2.15). A) Der Effekt von steigenden Konzentrationen (0,3-2,3 μ M) des Proteins PF0739 auf die Transkriptionsrate der *gdh*-C20-Kassette (Spuren 1-5) und der *pf0739/pf0740*-DNA-Matrize (Spuren 6-10). Die Ansätze wurden, wie in Kapitel 'Standard-Methoden und Materialien' im Anhang 1.1 ausgeführt, erstellt und nach einer 10-minütigen Inkubation bei 80 °C auf einem 15%igen Urea-PA-Gel getrennt. B) Der Effekt des PF0739 auf die Transkriptionsrate der *pf0739/pf0740*-DNA-Matrize bei steigender (Spuren 1-3) oder gleich bleibender (4-6) Konzentrationen an GTFs (TBP 95-190 nM, TFB 30-60 nM). Die Ansätze wurden auf einem 6%igen PA-Harnstoff-Gel getrennt. Die Auswertung erfolgte am Fuji FLA5000.

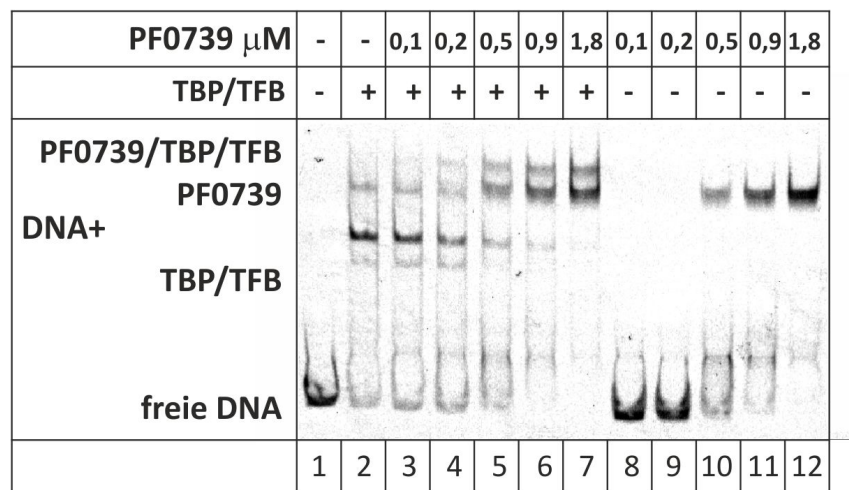


Abbildung 2.17.: Bindeaktivitäten von PF0739 an *pf0739*- und *pf0740*-Promotorsequenzen. Bei Einsatz von je 2 nM fluoreszenz-markierter *pf0739/pf0740*-DNA-Matrize wurde die Bindung von PF0739 an die Matrize mit und ohne GTFs untersucht. Die Reaktionen wurden im beschriebenen EMSA-Puffer (vgl. Kapitel 'Standard-Methoden und Materialien' im Anhang 1.1) für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend auf einem 6% igen nativen PA-Gel bei 200 V und etwa 40 °C separiert. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: TBP 360 nM, TFB 60 nM, PF0739 0,11 -1,7 μ M, Heparin 0,01 U.

DNase-Footprinting Mittels DNase-Footprints sollte die Zusammensetzung der DNA-TBP/TFB-PF0739-Komplexe bzw. das Bindeverhalten und die Bindeposition von PF0739 an die DNA-Matrize mit und ohne GTFs genauer untersucht werden. Mit Hilfe von HEX-markierten Primern wurden *pf0739*/*pf0740*-DNA-Matrizen erstellt, bei denen entweder der Strang mit Leserichtung der Promotorsequenz von *pf0739* (*pf0739*-Matrizen-Strang) oder derjenige von *pf0740* (*pf0740*-Matrizen-Strang) entsprechend 5'-markiert war (vgl. Abb. 2.18 B). Die DNA-Matrizen wurden mit den Proteinen PF0739, TBP und TFB in angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend einem DNase-Verdau unterzogen. Um die Position der Proteine an den Matrizen bestimmen zu können, wurden nach der Sanger-Methode Standards beider Matrizen angefertigt und neben den DNA-Fragmenten auf einem 4,5%igen PA-Gel getrennt. Die Auswertung erfolgte durch den AbiPrism337-Sequencer. Abb. 2.18 A zeigt das Ergebnis des Footprints. Im Vergleich zu den DNase behandelten freien DNA-Matrizen (Spuren 5 und 12) sind die Stränge durch die Proteinbindung an vielen Stellen nicht für die DNase zugänglich. Diese Schnittfragmente fehlen im Vergleich zum Kontrollverdau. Im Teil B der Abb.2.18 sind die durch die Schnittmuster abgeleiteten Bindestellen der Proteine an beiden DNA-Strängen wiedergegeben. Wird nur PF0739 zu den DNA-Matrizen gegeben, können die dadurch entstehenden Footprints an acht spezifischen Loci, verteilt über die Promotorstrukturen von *pf0739* und *pf0740*, ermittelt werden (vgl. Abb. 2.18 A Spuren 6 und 9 sowie B 1). Das entstandene Bindemuster lässt auf eine Multimerisierung des Proteins schließen, wie bereits durch den EMSA (vgl. Abb. 2.17) vermutet. Werden nur die GTFs allein zu den Matrizen gegeben, binden diese spezifisch an zwei Bereiche, die den jeweiligen Promotorelementen von *pf0739* und *pf0740* entsprechen (vgl. Abb. 2.18 A Spuren 7 und 10 sowie B 3). Bei der Kombination von PF0739 mit TBP und TFB entsteht bei der Matrizen-DNA eine Kombination aus den vor dem DNase-Abbau geschützten Fragmenten. Während für den Bereich der Matrizen, welche die Promotorelemente von *pf0739* tragen, die PF0739 Bindung dominiert, ist am Promotorbereich von *pf0740* deutlich der Footprint der Transkriptionsfaktoren TBP/TFB erhalten (vgl. Abb. 2.18 A Spuren 8 und 11 sowie B 2). Dieses Ergebnis erklärt auch die Resultate der *in vitro* Transkriptions-Analysen (vgl. Abb. 2.16). PF0739 bindet gezielt die Promotorstrukturen von *pf0740* und *pf0739*. Bei anwesenden GTFs wird der Promotorbereich von *pf0740* für diese frei. Damit könnten durch dieses System die GTFs vom eigentlich stärkeren *pf0739*-Promotor gezielt auf den *pf0740*-Promotor gelenkt werden, wodurch dieser aktiviert wird.

Die dargestellten Experimente legen die Schlussfolgerung nahe, dass der Transkriptionsfaktor PF0739 spezifisch für die Regulation der Genbereiche von *pf0739* und *pf0740* und eventuell einzelner weiterer Gene verantwortlich ist. Es konnte kein Einfluss des Faktors auf die Transkriptionsaktivität der RNAP an anderen DNA-Matrizen festgestellt werden (vgl. Abb. 2.16 A). Auch bei kombinierten Gelfiltrationen mit PF0739 und der RNAP konnte keine Interaktion beider Proteinkomplexe detektiert werden [Strobel, 2012]. Die Proteine eluieren in separaten Fraktionen und auch eine Verschiebung der Elutionsvolumens im Vergleich zu getrennten Chromatographien der Proteine wurde nicht ermittelt. Vielmehr konnte durch Ni-NTA-Chelatierungs-Experimente die Bindefähigkeit von PF0739 an das Metallion, wahrscheinlich über dessen intrinsischen Polyhistidinsequenz nachvollzogen werden [Strobel, 2012]. Folglich kann der Faktor bei der beschriebenen Reinigungsprozedur der mutierten RNAP RpoA" mit angereichert werden. Bei der anschließen-

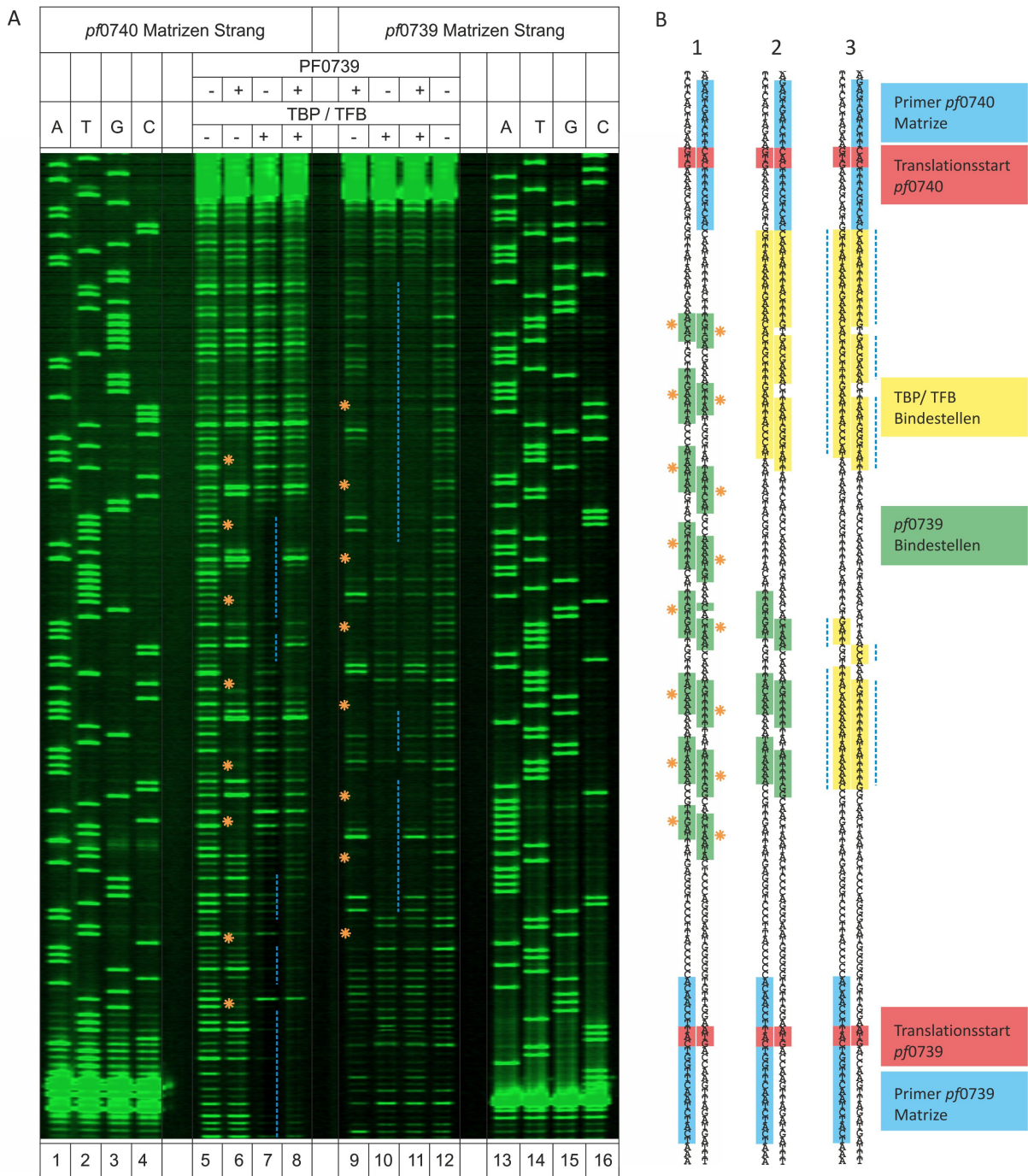


Abbildung 2.18.: DNase-Footprint mit PF0739 und TBP/TFB an der *pf0739/pf0740*-Promotorsequenz. A) DNase I-Verdau der *pf0739/pf0740*-DNA mit fluoreszenz-markierten *pf0739*-Matrizen-Strang (Spuren 5 bis 8) oder *pf0740* Matrizen-Strang (Spuren 9 bis 12) ohne (Spuren 5 und 12) und mit PF0739 (Spuren 6 und 9) und den GTFs (Spuren 7 und 10 sowie 8 und 11). Eingesetzte Konzentrationen: PF0739 2,8 μ M, TBP 1,0 μ M, TFB 0,8 μ M. Die mit T, A, G, C markierten Spuren stellen die Didesoxyribonukleosid-Terminationsreaktionen der jeweiligen Base für die DNA-Matrize dar. Es wurden pro Ansatz 20 ng (4,4 nM) *pf0739/pf0740*-DNA-Matrize und 0,05 U DNase I verwendet. B) Übersicht der ermittelten Bindestellen von PF0739 an beiden Matrizen Strängen in Abhängigkeit der GTFs TBP und TFB. Die PF0739-Footprints sind mit orangefarbenen Sternen, die Bereiche der durch die GTFs erzeugten Footprints durch blau gestrichelte Linien markiert.

den Gelfiltrations-Chromatographie war das Trennungsvermögen der Superdex 200 16/60 (Trennbereich 10-600 kDa) nicht ausreichend, um das als Decamer vorliegende PF0739 effizient von den RNAP-Komplexen zu trennen. Western Blot Analysen von PF0739 mit Rohextrakten verschiedener *P. furiosus*-Stämme zeigten keinen Unterschied im Expressionslevel des Faktors [Strobel, 2012]. Demnach liegt PF0739 in den *P. furiosus*-Zellen, welche RpoA" Δ Tip oder RpoA" H87P exprimieren nicht in größerer Menge vor als etwa in *P. furiosus*-RpoA" oder dem pYS3-Kontrollstamm (Daten nicht gezeigt). Auch in *P. furiosus*-pYS3-Zellen, bei denen die identische Reinigungsprozedur der RNAP, durchgeführt wurde, konnte das Co-Eluat nicht nachgewiesen werden. Daher kann nicht allein die geringe Menge an RpoA" Δ Tip-RNAP in den entsprechenden Zellen (vgl. Tab. 2.2.7) der Grund für die Reinigung von PF0739 sein.

2.4. Diskussion

Expression und Reinigung der RpoA"-RNAP-Mutanten. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Shuttle-Vektor-System nicht nur die regulierbare Expression von endogenen Proteinen in *P. furiosus* ermöglicht, sondern das System auch für die Produktion von rekombinanten und modifizierten RpoA"-Untereinheiten in *P. furiosus* angewendet werden kann. Im Vergleich zur bisher gängigen Rekonstitution der RNAP aus den einzelnen in *E. coli* produzierten Untereinheiten bietet dieses System mehrere Vorteile. Zum einen erweist sich die Expression mancher hyperthermophiler Proteine in *E. coli* aufgrund der toxischen Effekte, welche durch Wechselwirkungen der Komponenten mit dem Zellstoffwechsel des Wirts entstehen können, als schwierig. Zum anderen müssen die einzeln produzierten Untereinheiten in der Folge erst zu kompletten RNAP-Komplexen rekonstituiert werden [Naji *et al.*, 2007], was mit relativ großen Verlusten der Ausbeute an aktiver RNAP verbunden ist. Diese Probleme entfallen bei der direkten Produktion der Proteine in *P. furiosus*. Es wurde gezeigt, dass bei der Produktion der modifizierten RpoA"-Untereinheiten, welche zu inaktiven RNAP-Komplexen führen sollten, die *P. furiosus*-Zellen vital sind. Vorangehenden Analysen zufolge [Fouqueau *et al.*, 2013] war davon auszugehen, dass der Trigger Loop-Bereich nicht nur bei der Nukleotid-Addition eine entscheidende Rolle spielt, sondern auch an weiteren Funktionen der RNAP, wie Initiation und Termination der Transkription, sowie Proofreading entscheidend beteiligt ist. Es war daher naheliegend, dass bei der entstehenden RNAP RpoA" Δ Tip im Vergleich zur Punktmutante noch weitaus schwerwiegendere Defekte vorliegen und die *P. furiosus*-Zellen durch alleinige Expression dieser Variante der Untereinheit nicht lebensfähig wären. Auch bei entsprechenden Versuchen in *S. cerevisiae* war es nicht gelungen analoge Stämme zu generieren [Kaplan *et al.*, 2008]. Durch die simultane Präsenz von endogener und mutierter RpoA"-Untereinheit in den Zellen wird das Überleben von *P. furiosus* gewährleistet. Dennoch werden auch die defekten RpoA"-Untereinheiten in den Zellen entsprechend der wt Untereinheit in die entstehenden RNAP-Komplexe eingebaut. Die komplett assemblierten Polymerase-Komplexe inklusive der veränderten Untereinheiten können, wie bereits für die Hexahistidin-getaggte RpoD-RNAP gezeigt, über die genannte Fusion in zwei Schritten effizient aus *P. furiosus*-Zelllysaten isoliert werden. Hierbei wurden signifikante Unterschiede in der Menge an der aus den Zellen gereinigten RNAPs festge-

stellt (vgl. Tabelle 2.1). Im Unterschied zu der erhaltenen Mengen an RpoD- oder RpoA"-RNAP, welche aus einer konstanten Zellmasse gereinigt werden konnten, lagen die Ausbeuten der RpoA" H87P-RNAP etwas bzw. der RpoA" Δ Tip-RNAP deutlich unter diesen Werten. Damit scheint die Ausbeute zum einen mit der Wahl der getaggen RNAP-Untereinheit und im Besonderen mit der Art der Manipulation zusammen zu hängen. Bei der RpoA" Δ Tip handelt es sich um eine mutierte Untereinheiten-Version die starke Effekte auf die Aktivität der RNAP hat und somit auch den Zellstoffwechsel enorm beeinflusst. Daher ist die Ausbeute dieser RNAP-Mutante um ein vielfaches geringer, als bei der unveränderten Hexahistidin-RpoA"-RNAP. Bei Annahme einer identischen Produktionsrate der RpoA" und RpoA" H87P Untereinheiten in den Zellen, weist dies auf den gezielten Abbau der defekten Untereinheit bzw. der resultierenden inaktiven Polymerase hin. Die Entfernung der RpoA" H87P Untereinheit bzw. RNAPs bietet eine mögliche Erklärung für die verminderte Reinigungseffizienz der RpoA" H87P RNAP (vgl. Tabelle 2.1). In den Zellen könnten die als defekt erkannten RNAP-Komplexe oder die defekten Untereinheiten selbst, erkannt durch Enzymaktivitäten aus dem Stoffwechsel entfernt werden. Hierbei wurde vermutet, dass im speziellen die RpoA" Δ Tip-RNAP aufgrund ihrer mangelnden Transkriptionskompetenz (vgl. Abb. 2.12) verstärkt an den Promotorstrukturen der DNA zu finden sein müsste, da eine entsprechende DNA-Bindfähigkeit und Open-Complex-Bildung nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 2.10 und 2.11). Die Klärung, ob eine 'Anreicherung' der defekten RpoA" Δ Tip-RNAPs an den Promotorbereichen tatsächlich stattfindet, oder durch welche Mechanismen sie entsprechend verhindert wird, bietet weitere interessante Ansatzpunkte zur Untersuchung der weiterreichenden Veränderungen des Expressionsniveaus der *P. furiosus*-Stämme, welche mutierte Enzymkomplexe produzieren. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Modifikation der Untereinheit die Epitopen-Erkennung der entsprechenden Antikörper gegen die RpoA" Untereinheit herabgesetzt wird und durch diesen Effekt zusätzlich der Gehalt an RpoA" H87P im Vergleich zur wt Untereinheit reduziert erscheint. Welcher Mechanismus jedoch eventuell wirkt, um den schädlichen Einfluss der defekten RNAP-Komplexe zu minimieren, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt. Vorstellbar wäre hierbei, dass Mechanismen wirksam, die die DNA-Sequenz auf dem Expressionsvektor in einer Art und Weise verändern, dass so wieder wt RpoA"-Untereinheiten ohne Hexahistidin-Tag und sonstige Mutation entstehen. Diese RNAP-Komplexe würden in der Folge für die Analysen nicht mehr erfasst werden. Es existieren noch viele weitere Möglichkeiten, die ursächlich für die verminderte Ausbeute bei der Proteinreinigung sind.

Struktur-Funktions-Analyse der mutierten RpoA"-RNAPs. Mit Hilfe der erzeugten RpoA"-Mutanten und RNAPs, RpoA" H87P und RpoA" Δ Tip, konnten die von Fouqueau [Fouqueau *et al.*, 2013] mittels rekonstituierter RNAPs erlangten Erkenntnisse nachvollzogen und bestätigt werden. Obwohl der Schwerpunkt dieser Arbeit nicht in der exakten Analyse der Effekte der Mutationen von RpoA" in allen Phasen und Bereichen des Transkriptionsvorgangs lag, konnten bei den vorgenommenen Untersuchungen ausgewählter Phasen der Transkription die Effekte der Mutationen in ihrer Tendenz bestätigt werden. Wie erwartet haben die vorgenommen Mutationen im Trigger Loop der RpoA"-Untereinheit signifikante Auswirkungen auf die Transkriptionskompetenz (vgl. Abb. 2.12), besonders der Elongationsfähigkeit der Polymerasen, während die

Rekrutierung und Open-Complex-Bildung der Enzyme nicht, oder nur sehr wenig beeinflusst zu sein scheint (vgl. Abb. 2.10 und 2.11). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass auch die Bereiche, für die in dieser Arbeit keine Daten erhoben wurden, wie etwa Transkriptionstermination oder Proofreading-Fähigkeit der RpoA^{''} H87P und RpoA^{''} Δ Tip-RNAPs, analog durch die Mutationen beeinflusst wären wie dies bei den rekonstituierten RNAPs von Fouqueau [Fouqueau *et al.*, 2013] der Fall war. Im Vergleich zur herkömmlichen Proteinfunktionsanalyse mittels Substitution von Aminosäureresten bei der punktuell gegen das neutral geladene Alanin ersetzt wird, wurde in diesem Fall jedoch die Substitution des betroffenen Aminosäurerests gegen ein Prolin durchgeführt. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Mutationsstudie hierdurch nicht wesentlich beeinflusst wird. Bei der Aminosäure Histidin an Position 87 handelt es sich um einen für die Transkription essentiellen Rest und bereits die 2008 von Kaplan [Kaplan *et al.*, 2008] durchgeführte Studien mit der Pol-II bei *S. cerevisiae* zeigten deutliche Auswirkungen der verschiedenen Punktmutationen von H1085 (entspricht bei *P. furiosus* H87). Demzufolge führte jeder Austausch dieses Histidin-Restes mit einer anderen Aminosäure zum Funktionsverlust der Pol-II bzw. zu schweren Wachstumsdefiziten der Hefestämme [Kaplan *et al.*, 2008].

Reinigung und Charakterisierung von PF0739. Bei der Reinigung der verschiedenen RNAP-Versionen aus den Zelllysaten von *P. furiosus* war neben der großen Varianz der Ausbeuten auch die spezifische Reinigung des Transkriptionsfaktors PF0739 mit den mutierten RpoA^{''}-RNAPs auffällig (vgl. Abb. 2.8). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der Faktor PF0739 keinen Einfluss auf die Aktivität der RNAP am verwendeten Promotor der GDH hat (vgl. Abb. 2.16 A) und auch keine direkten Wechselwirkungen mit der wt RNAP eingeht [Strobel, 2012]. Daher erscheint es eher ausgeschlossen, dass es einen direkten funktionalen Zusammenhang zwischen der erzeugten RNAP-Mutante und dem Transkriptionsfaktor PF0739 gibt. Vielmehr ist nach dem aktuellen Kenntnisstand davon auszugehen, dass der Faktor aufgrund seiner Multimerisierung und einer endogenen Histidin-reichen Region bei der durchgeführten Reinigungsprozedur mit den RNAP-Komplexen isoliert und angereichert wurde. Bei zusätzlichen Tests wurde die starke Affinität von PF0739 sowohl an eine Nickel-beladene Matrix als auch eine Heparin-enthaltende Matrix dokumentiert. Durch analytische Gelfiltrations-Chromatographie, bei der anhand des Elutionsvolumens des Proteins PF0739 und von Standardproteinen bekannter Masse Rückschlüsse auf die Masse des gesuchten Proteins gezogen werden können, ergaben keine monomere Konformation von PF0739 [Strobel, 2012]. Vielmehr lässt das Elutionsvolumen des Proteins auf eine decamere Zusammensetzung des eigentlich nur etwa 24 kDa großen Proteins schließen. Aus diesen Gründen ist plausibel, dass PF0739 bei der Reinigung der Hexahistidin-fusionierten RNAP in der Ni-Chelatierung co-gereinigt wurde und im zweiten Schritt der Gelfiltration durch mangelnde Auflösung nicht von den 380 kDa großen RNAP-Komplexen getrennt werden konnte. Warum die Kontamination durch PF0739 spezifisch bei der RpoA^{''} Δ Tip- und auch in geringerem Maß bei der RpoA^{''} H87P-RNAP auftritt, kann nicht abschließend geklärt werden. Durch Western Blot Analysen wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor mit gleichbleibendem Niveau in allen untersuchten *P. furiosus*-Stämmen vorliegt. Die Entstehung und der biochemische Charakter der vorliegenden PF0739-Varianten, also einer regulären und einer verkürzten Proteinversion, wurden

bisher nicht weiter untersucht. Daher kann über Ursache und Zweck der PF0739-Varianten bzw. einem Zusammenhang mit den erzeugten RpoA⁺-RNAP-Mutanten keine Aussage getroffen werden. Weitere Analysen von PF0739 und des gesamten Proteoms könnten hilfreich sein, um eventuelle Modifikationen des Transkriptionsfaktors PF0739 zu ermitteln, oder zusätzliche Zellkomponenten zu identifizieren, welche mit PF0739 interagieren. Die Kenntnisse über Modifikationen oder zusätzlichen Faktoren könnten für die Aufklärung des Phänomens der Co-Purifikation von PF0739 ausschlaggebend sein.

Funktionsanalyse von PF0739. Bei der Analyse der Funktion von PF0739 konnte eindeutige DNA-Bindeaktivität im Bereich der Promotorelemente von *pf0739* und *pf0740* ermittelt werden (vgl. Abb. 2.17 und 2.18). Zudem konnte auch eine Beeinflussung der Transkriptionsraten beider Gene in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors bei *in vitro* Transkriptionsexperimenten beobachtet werden (vgl. Abb. 2.16). Somit ist davon auszugehen, dass PF0739 an der spezifischen Regulation der Genexpression von *pf0739* und *pf0740* und eventuell weiterer, noch unbekannter Genloci involviert ist. Wie beschrieben, ist der Genbereich des putativen Transkriptionsregulators PF0739 im Chromosom mit entgegengesetzter Leserichtung neben dem Genbereich einer Metallionen-transportierenden cpx-Typ-ATPase (*pf0740*) lokalisiert. Für *S. solfataricus* ist von vergleichbaren ATPasen bekannt, dass sie durch den entsprechenden Transkriptionsfaktor reguliert werden und zur Kupferresistenz der Zellen beitragen [Völlmecke *et al.*, 2012]. Obwohl der genaue Mechanismus bisher nicht aufgeklärt werden konnte, scheinen Kupfer-Efflux und -Absonderung die Basis der Kupfer-Homöostase bei *Sulfolobus* zu bilden [Villafane *et al.*, 2009].

PF0739 Homologe Bei *S. metallicus* wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen Exposition der Zellen mit Schwermetallen und dem Anstieg des Transkriptionslevels des *cop*-Genclusters ermittelt [Orell *et al.*, 2013]. Jedoch weicht die Genstruktur des beschriebenen *cop*-Genclusters deutlich vom Aufbau in *P. furiosus* ab. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass hier ein identischer Kupfer-Response-Mechanismus zu finden ist. Bereits bei Studien zur Dynamik des *P. furiosus*-Genoms [Bridger *et al.*, 2012] und der Abstammung von CRISPR-Elementen [Portillo und Gonzalez, 2009] wurden die starken Homologien der Genstrukturen in diesem chromosomalen Bereich bei den *Thermococcales* untersucht und als Beweis für den mit CRISPR-Elementen assoziierten horizontalen Gentransfer bei *P. furiosus* und den *Thermococcales* angesehen. Beinahe 80 % der Gensequenzen existieren nur in den *Thermococcales* und sind daher wahrscheinlich auch innerhalb der Ordnung entstanden. Während bei *P. furiosus* nur der Transkriptionsregulator und simultanes Metallionen-Bindeprotein PF0739 (entspricht *copRT*) und die entsprechende Metallionen-transportierende ATPase PF0740 existieren, besteht das *cop*-Gencluster in *S. solfataricus* aus mehr Elementen [Villafane *et al.*, 2009]. Der Kupfer-abhängige Transkriptionsregulator *copR* liegt neben dem Kupfer-Bindeprotein *copT* separat vor, daran anschließend ist der Kupfer-transporter *copA* geschaltet. Durch den P-Typ ATPase-Kupfertransporter *copA* werden überschüssige Kupfer-Ionen aus den Zellen transportiert und diese somit vor den schädigenden Einflüssen der Metallionen geschützt. Die drei Gene des *copRTA*-Genclusters sind in derselben Richtung orientiert und werden co-transkribiert. Obwohl der Mechanismus noch nicht im Detail geklärt wur-

de, ist bekannt, dass bei Abwesenheit von Kupfer *copRTA* konstitutiv basal vom *copR*-Promotor transkribiert wird, wohingegen durch Kupferexposition die Transkription von *copTA* an einem zweiten stromaufwärts gelegenen Promotor induziert wird. Es wird angenommen, dass es sich um einen Rückkopplungsmechanismus handelt. Sinkt der Kupfergehalt im Zytoplasma durch die Aktivität des Transporters, wird dessen Transkription weniger stark induziert. Wie erwähnt weicht die Genstruktur bei *P. furiosus* stark von der Situation in *Sulfolobus* ab. Da die Gensequenzen gegenläufig angeordnet sind, kann eine Co-Transkription ausgeschlossen werden. Zwar konnte bei *in vitro* Transkriptionen die Induktion der *pf0740*-Genexpression durch PF0739 bestätigt werden, dennoch scheint insgesamt ein abweichender Regulationsmechanismus vorzuliegen. Erste EMSA-Gelretardierungs-Experimente deuten darauf hin, dass bei Anwesenheit von Metallionen, vor allem durch Cu^{2+} , Mg^{2+} und Ag^{2+} , die DNA-Bindfähigkeit von PF0739 stark vermindert wird (Daten nicht gezeigt). Weiterhin deuten DNase-Footprinting (vgl. Abb. 2.18) sowie die *in vitro* Transkriptionsstudien (vgl. Abb. 2.16) darauf hin, dass bei gleichzeitigem Vorliegen von GTFs und PF0739 der Faktor vermehrt an den Promotorbereich von *pf0739* bindet. Die beobachtete Induktion von *pf0740* bei gleichzeitiger leichter Reprimierung von *pf0739* könnte demnach auf die Umleitung der GTFs von dem eigentlich stärkeren *pf0739*-Promotor auf den schwächeren *pf0740*-Promotor durch die Blockierung der *pf0739*-Bindestellen verursacht werden. Demzufolge wäre jedoch in Anwesenheit von Kupfer oder einem der anderen relevanten Metallionen die Bindung von PF0739 an den *pf0739*-Promotorstrukturen vermindert und damit auch die Transkription von PF0740 weniger induziert. Diese Befunde sprechen gegen einen zu *Sulfolobus* analogen Mechanismus. Weitere Studien sind aus diesem Grund nötig, um Klarheit zu schaffen und eventuell noch unbekannte beteiligte Faktoren zu identifizieren.

Fazit. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es mit dem etablierten Shuttle-Vektor-System auch möglich ist, mutierte rekombinante Proteine in *P. furiosus* darzustellen. Im Falle der erzeugten Mutanten der RpoA"-Untereinheit konnten die entsprechenden assemblierten RNAP-Komplexe isoliert und für Funktionsanalysen eingesetzt werden. Dabei konnten durch *in vitro* Rekonstitution der mutierten RNAPs von Fouqueau [Fouqueau *et al.*, 2013] erhobene Daten weitestgehend bestätigt werden. Wie erwartet, führen die Modifikationen im Bereich des Trigger Loops der RpoA"-Untereinheit zu schwerwiegenden Defekten der Transkriptionsaktivität der RNAPs. Das bei der Reinigung der mutierten RpoA"-RNAPs co-Eluat PF0739 wurde charakterisiert. Der Transkriptionsfaktor hat dabei eindeutig keinen Einfluss auf die Aktivität der RNAPs. Vielmehr scheint er an der spezifischen Regulation einer Metallionen-Transport-ATPase beteiligt zu sein, welche durch Efflux die toxischen Effekte von hohen Metallionen-Konzentrationen in der Zelle verhindert. Zusätzlich zur Produktion von rekombinanten, modifizierten Proteinen liefert das Shuttle-Vektor-System auch eine gute Basis zur *in vivo* Analyse der mutierten *P. furiosus*-Stämme. Durch Proteom-Untersuchungen könnten so in Zukunft tiefere Erkenntnisse über die Auswirkungen von Mutationen auf den gesamten Zellstoffwechsel, betroffene Signaltransduktionsprozesse oder Reparatur- bzw. Abbau-Mechanismen gewonnen werden.

3. Charakterisierung von TrmBL2

Das im vorigen Kapitel beschriebene Shuttle-Vektor-Expressionssystem wurde als Grundlage zur Etablierung von Methodiken zur chromosomalen Manipulation von *P. furiosus* verwendet. Basierend auf den bewährten Techniken der Integration von Fremd-DNA in *P. furiosus*-Zellen und deren Selektion stand im Folgenden die Generierung diverser rekombinanter Konstrukte durch chromosomale Integration der Fremd-DNA im Fokus. Die Etablierung eines stabilen Konstrukts sollte anhand der *pf0496* Gensequenz mittels homologer Rekombination und einem doppelten Crossing-Over gezeigt werden. Voraussetzung dafür ist zum einen eine entsprechende enzymatische Ausstattung des DNA-Reparaturmechanismus der Zellen und zum anderen eine geeignete Komposition des verwendeten DNA-Konstruktes. Für den Mechanismus der homologen Rekombination ist vor allem die Länge der homologen DNA-Sequenzen und die Länge des gesamten DNA-Konstruktes im Vergleich zu der Region, die verändert werden soll, relevant. Basis dieser Arbeit waren Ergebnisse von Studien zur Etablierung stabiler Mutanten bei *T. kodakarensis* [Sato *et al.*, 2003]. Anhand einer Gendeletion unter Verwendung des Simvastatin-Resistenzmarkers sollte nun ein genetisches System für *P. furiosus* etabliert werden. Dieses könnte anschließend als Ausgangspunkt für den weiteren Ausbau der genetischen Hilfsmittel, für Optimierungen und weitere Anpassungen der Methodiken verwendet werden.

3.1. Einleitung

3.1.1. Regulation der Transkription bei Archaeen

Transkriptionsregulatoren können die Transkription beeinflussen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Repressoren, welche die Expression eines Gens hemmen, und Aktivatoren, welche die Expression stimulieren. Die Transkriptionsregulatoren binden an eine spezifische Sequenz, ein Bindemotiv, und beeinflussen dadurch die Assoziation der generellen Transkriptionsfaktoren oder der RNA-Polymerase an die DNA, wodurch die Transkription des folgenden Gens aktiviert oder reprimiert wird. Zudem besitzen Transkriptionsregulatoren häufig spezifische Effektormoleküle, welche wiederum die Bindeaffinität des Regulators an dessen DNA-Bindesequenz beeinflussen [Aravind und Koonin, 1999]. Die Regulation der Genexpression verläuft bei Archaeen nach Mechanismen, die bei der bakteriellen Genregulation nachgewiesen wurden [Bell und Jackson, 2001, Geiduschek und Ouhammouch, 2005]. Somit weist das archaeele System eine Kombination von Elementen der Bacteria und Eukarya auf [Bell und Jackson, 1998]. Obwohl der Ablauf der basalen archaeeellen Transkription und die daran beteiligten Komponenten viele Gemeinsamkeiten mit dem System der Eukarya bzw. des Pol-II Transkriptionsapparates aufweisen, erfolgt die Regulation der Transkription bei vielen archaeeellen Regulatoren nach Mechanismen, die aus Bak-

terien bekannt sind [Bell, 2005]. So wurden eine Reihe von Transkriptionsregulatoren bei Archaea identifiziert, die ortholog zu bakteriellen Regulatorproteinen sind. Häufig sind dies Transkriptionsfaktoren aus der Helix-Turn-Helix-Superfamilie [Ouhammouch, 2004, Kyrpides und Ouzounis, 1999]. Zudem wurden sowohl archaeen-spezifische Regulatoren, als auch zu eukaryotischen Proteinen homologe Regulatoren identifiziert. Durch die steigende Anzahl sequenzierter archaeeller Genome wächst die Anzahl potentieller Transkriptionsregulatoren stetig. Bei *P. furiosus* und Archaeen im Allgemeinen erfolgt die negative Regulation der Transkription im Wesentlichen über die Behinderung der Rekrutierung der RNAP [Geiduschek und Ouhammouch, 2005]. Die Repressoren binden den Promotor im Bereich der BRE/TATA-Region oder des Transkriptionsstarts und verhindern so die Anlagerung der GTFs bzw. die Rekrutierung der RNAP. Seltener ist die positive Regulation, bei der es zur erleichterten Rekrutierung von TBP oder TFB kommt oder diese erst ermöglicht wird, indem die Aktivatoren an Bereiche stromaufwärts der BRE/TATA-Region binden [Ouhammouch *et al.*, 2003, Ochs *et al.*, 2012]. Bei Halobakterien sind zudem mehrere Paraloge von TBP und TFB bekannt, die eine differentielle Genexpression über alternative TBP-TFB-RNAP-Komplexe vermuten lassen [Lu *et al.*, 2008]. In *P. furiosus* sind neben LrpA (Leucine-responsive regulatory protein A) bisher die Regulatorproteine Phr (*Pyrococcus* heatshock regulator), SurR (Sulphur response regulator), TBP-RF1 (TBP-recruiting factor 1), TrmB und TrmBL1 näher charakterisiert worden. In nachstehender Tabelle (Tabb. 3.1) sind die bisher bekannten Transkriptionsregulatoren der *Thermococcales* und ihre jeweilige Wirkungsweise zusammengestellt.

3.1.2. Der Transkriptionsregulator TrmB

Das Regulatorprotein TrmB (Transcriptional regulator of the maltose system B) wurde als Regulator des Trehalose/Maltose-ABC-Transporters identifiziert (TM-System). Die Expression des *trmB* wird durch Maltose und Trehalose induziert [Lee *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2005]. Zudem reguliert TrmB auch die Transkription der Gene des Maltodextrin-ABC-Transporters (MD-System). TrmB fungiert dabei als Repressor der Transkription. Der Regulator bindet wahrscheinlich über ein HTH-Motiv an seinem N-terminalen Ende die TM-Promotor-DNA im Bereich der BRE/TATA-Box. Die Transkription wird so gehemmt, da die Bindung der Transkriptionsfaktoren TBP und TFB verhindert wird. Verschiedene Zucker können als Effektoren wirken und eine Interaktionen mit der Zucker-Bindedomäne im C-Terminus des Proteins die Bindeaktivität von TrmB an die DNA beeinflussen [Krug *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2008]. So kann etwa im Fall des TM-Systems eine durch TrmB vermittelte Repression durch die Zucker Maltose und Trehalose, nicht jedoch durch Sucrose oder Maltodextrin, aufgehoben werden. Maltose, Trehalose und einige weitere Zucker können an die Zucker-Bindedomäne des Regulators binden und verursachen damit eine Konformationsänderung des Proteins. Diese bewirkt, dass TrmB sich von der Promotorregion löst und die BRE/TATA-Box wieder für die Transkriptionsfaktoren freigibt, wodurch die Expression des TM-Systems induziert wird.

Die Anordnung der Gene des MD-Operons ist dem TM-Gencluster sehr ähnlich, jedoch fehlt im MD-System ein Gen, das für einen Transkriptionsregulator kodiert. Auch hier fungiert TrmB als Transkriptionsrepressor. Allerdings bindet der Regulator nicht im Bereich der BRE/TATA-Box, sondern weiter stromabwärts im Bereich des Transkriptionsstarts. Dadurch können hier die GTFs

Tabelle 3.1.: Transkriptionsregulatoren der *Thermococcales*.

Regulator, Organismus, Referenz	Funktion	Effektor	Mechanismus
LrpA , <i>P. furiosus</i> , [Brinkman <i>et al.</i> , 2000, Leonard <i>et al.</i> , 2001, Dahlke und Thomm, 2002]	Repressor des eigenen Gens (<i>lrpA</i>) (Autoregulation)	unbekannt	bindet stromabwärts der BRE/TATA-Box im Bereich des Transkriptionsstarts; verhindert Rekrutierung der RNAP
Phr , <i>P. furiosus</i> , [Keese <i>et al.</i> , 2010, Vierke <i>et al.</i> , 2003]	Repressor autoregulierte sein eigenes Gen (<i>phr</i>); kontrolliert Gene für Hitzeschockproteine und das <i>mips</i> -Gen (<i>myo</i> -Iositol-1-Phosphat-Synthase)	Temperaturen über 100 °C	bindet stromabwärts der BRE/TATA-Box im Bereich des Transkriptionsstarts; verhindert die Rekrutierung der RNAP
SurR , <i>P. furiosus</i> , [Lipscomb <i>et al.</i> , 2009]	kontrolliert den Schwefelstoffwechsel als Repressor des Gens der Proteindisulfid-Oxidoreduktase (<i>pdo</i>) und der NAD(P)H-abhängigen Schwefelreduktase (<i>nsr</i>) und als Aktivator der Gene der Hydrogenase I (<i>mbh1</i> und <i>hydB1</i>) sowie seines eigenen Gens (<i>surR</i>)	Schwefel	bindet promotorabhängig stromauf- oder stromabwärts oder im Bereich der BRE/TATA-Box; erleichtert (Aktivierung) oder verhindert (Reprimierung) die Bindung von TBP/TFB und der RNAP
TFB-RF1 , <i>P. furiosus</i> , [Ochs <i>et al.</i> , 2012]	Aktivator des Gens <i>pf1089</i>	unbekannt	bindet stromaufwärts der BRE/TATA-Box von <i>pf1089</i> ; erleichtert die Bindung von TFB an das BRE-Element
Tgr , <i>T. kodakarensis</i> , [Kanai <i>et al.</i> , 2007]	Repressor der Gene der Glykolyse und Aktivator der Gene der Glukoneogenese	Maltotriose	bindet das TGM-Motiv stromauf- oder stromabwärts der BRE/TATA-Box; erleichtert die Bindung von TBP und TFB (Aktivierung) bzw. verhindert Rekrutierung der RNAP (Repression)
TrmB , <i>P. furiosus</i> , [Lee <i>et al.</i> , 2003, Lee <i>et al.</i> , 2006]	Repressor der Gencluster der TM- und MD-Transporter, und dem Gen der Phosphofruktokinase (Glykolyse)	Maltose, Trehalose, Maltotriose, Sucrose, Glukose	bindet promotorabhängig im Bereich der BRE/TATA-Box (TM-Promotor) oder des Transkriptionsstarts (MD-Promotor); verhindert die Bindung von TBP/TFB bzw. die Rekrutierung der RNAP
TrmBL1 , <i>P. furiosus</i> , [Lee <i>et al.</i> , 2008]	Repressor der Gene der Glykolyse und der Gencluster des TM- und MD-Transporters; autoregulierte sein eigenes Gen; Aktivator der Gene der Glukoneogenese	Maltose, Maltotriose, Fruktose, Glukose	bindet promotorabhängig stromaufwärts (Aktivierung) oder stromabwärts (Reprimierung) der BRE/TATA-Box; verhindert RNAP-Rekrutierung (Repression) oder erleichtert Bindung der Transkriptionsfaktoren (Aktivierung)

an den Promotor binden, die Rekrutierung der RNAP jedoch wird vom Regulator verhindert. Für das MD-System konnte die Inhibierung der Transkription durch TrmB von Maltotriose und Sucrose aufgehoben werden, jedoch nicht durch Maltose und Trehalose [Lee *et al.*, 2005]. Demzufolge besitzt TrmB ein breites Spektrum an Zuckersubstraten und wirkt promotorabhängig, je nach Anwesenheit an Induktoren, auf verschiedene Weise.

Die C-terminale Zucker-Bindedomäne von TrmB setzt sich aus einer C- und einer N-terminalen Untereinheit zusammen, welche die Zuckerspezifität bewirken [Krug *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2008]. Die verschiedenen Zucker treten vermutlich mit unterschiedlichen Kombinationen der Aminosäurereste in Kontakt, wodurch es zu substratabhängigen Konformationsänderungen von TrmB kommt, die wiederum die Promotorerkennung beeinflussen. Umgekehrt scheint über die Bindung von TrmB an die Nukleotidsequenz ebenso die Konformation der DNA-Bindedomäne zu variieren. Diese Strukturveränderungen können sich dann wieder auf die Zucker-Bindedomäne übertragen und so die promotorabhängige Substratspezifität des Regulators bestimmen [Krug *et al.*, 2013].

3.1.3. Regulatoren der TrmB-Familie in *P. furiosus*

Im Genom von *P. furiosus* konnten neben TrmB noch drei weitere TrmB-homologe Proteine identifiziert werden, TrmBL1 (TrmB-Like 1), TrmBL2 und TrmBL3 (vgl. Abb. 3.1) [Lee *et al.*, 2007a]. In allen anderen Spezies der *Thermococcales* konnten TrmB-orthologe Sequenzen nachgewiesen werden. Gleichfalls konnte auch in anderen Ordnungen der Archaea, etwa bei dem *Halobacteriales* [Schmid *et al.*, 2009] die Beteiligung von Proteinen der TrmB-Familie an der Transkriptionsregulation von Stoffwechsellzymen nachgewiesen werden. Vertreter der TrmB-Familie scheinen demnach in Archaeen ubiquitär vorzukommen. Allerdings gibt es nicht in allen untersuchten Organismen der *Thermococcales* sämtliche Vertreter der TrmB-Familie (vgl. Tabelle 3.2).

Das TrmBL1-Protein aus *P. furiosus* umfasst 431 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 39,4 kDa. Die Sequenzhomologie zu TrmB beträgt über das gesamte Protein 29 %. Wird jedoch nur der N-Terminus mit der DNA-Bindedomäne betrachtet, liegt die Sequenzhomologie bei 45 %. Zwischen TrmBL1 (PF0124) aus *P. furiosus* und dem TrmBL1-orthologen Protein Tgr (*Thermococcales* glycolytic regulator, TK1769) aus *T. kodakarensis* besteht 67 % Sequenzidentität. TrmBL1 ist ein globaler Regulator im Zuckermetabolismus und hat eine wichtige Funktion am Umschalt- punkt von Glykolyse und Glukoneogenese. Dabei kann TrmBL1 sowohl als Aktivator wie auch als Repressor fungieren; Maltose und Maltotriose wirken als Effektoren. Der Regulator hemmt die glykolytischen Gene des MD-Systems und stimuliert die Transkription der Gene, welche für Enzyme der Glukoneogenese kodieren. Dies konnte durch Studien eines erzeugten *T. kodakarensis* Tgr-Deletionsstammes und Microarray-Analysen ermittelt werden [Kanai *et al.*, 2007]. Als DNA-Bindestelle für TrmBL1 dient unter anderem das TGM, welches vor oder hinter der BRE/TATA-Sequenz der regulierten Gene lokalisiert [Kanai *et al.*, 2007]. Beim *Thermococcales* glycolytic motif (TGM) handelt es sich um eine Sequenz aus einem 'reverted repeat', die durch fünf Nukleotide unterbrochen wird: TATCACNNNNNGTGATA. Als Repressor glykolytischer Gene bindet TrmBL1 das TGM stromabwärts der BRE/TATA-Box und verhindert so die RNAP-Rekrutierung durch den

TrmB	MEIPPEISHALSEIGFTKYEILTYWTLVYGPSTAKEISTKSGIPYNRVYDTISSLKLGRGFVTEIEGTPKVYAAYSRIA	80
TrmBL1	-MLEEEILQKLQKFGLTQYESLAYLTLLKLGPSKATDVTKESGIPHTRIYDVLSSLARKGFVDIVHGTPRLYAPVNPEIV	79
TrmBL2	MSKDRMVELLQEHFELNLYEARAYVALVAFGLTPAELASVSEVPAPRTYDVLRSLEKKGFAMTQPGKTNKYRFPVHPANV	80
TrmB	FFRFKKELEDIMKKLEIELNNVKKEEQ--RPAIWRSRSFDEAIEMFRESLYSAKNEVIVVTPSEFFETIREDLIKTLER	157
TrmBL1	LEKIREDLISDIERLKKAFQELYREVHGEELPEIWTVHGFENTIDRAQHIIIRSAKHDILINTPYEFLEYLRGVLEKRNVDV	159
TrmBL2	LEKFIQDWQERVKEELEAKKKAKEELLEMAPLIET--EVPKYGVERVWVRGIKNSTLTKT--EMLEEAQNEILLADDG	156
TrmB	GVTVSLYIDKIPDLSEFKGKGNFFVRQFYKLNHLIG--MTDGKEVVTIQNATFDSIGPPSFKSTYPEIIFSQVSLIIEIF	235
TrmBL1	LIIVISNFSEIP--LWLRNKNVILARSGQAPWLLGTWVIGDINYALFFGTLPEDKGKERFYSEFWVKSTRLIQNYVHWFY	237
TrmBL2	FIAVNLEDDIIK--AVDRGVKTKILLTKNLLPRLKASKIIDYAKEGKLELRALDKFDLP-MLICDEEVFFFAEDLAARYF	233
TrmB	KESTLEKEIIG--NPKDIRFFAMFHAVDFVNHLKNR--NIYAEITGKNLESGRLETITGRVVGYYTSLREAVNNIHLET	311
TrmBL1	TMYFDNSEIVKPLNYERMEKPLTSLHIRTIVTVLKQAGLPRNIEVIGRSLADKKQVTIKGKVIDYEYTP--LTANITVKT	315
TrmBL2	NYET-----QVWIKDHRVVALFKEK-----	253
TrmB	ENGVVKVGGMFAVIEDYESTEIFMIG	338
TrmBL1	DNKKIKVGGLGSYLEDIGESFILLD-	341
TrmBL2	-----FNEYWEKAQKV-----	264

* strikt konservierte Reste
: hoch konservierte Reste
. schwach konservierte Reste

Abbildung 3.1.: Multiples Sequenz-Alignment von TrmB, TrmBL1 und TrmBL2 aus *P. furiosus*. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt. Die Zeichenlegende ist in der Abbildung wiedergegeben.

TBP/TFB-DNA-Komplex. Als Aktivator der gluconeogenetischen Gene wird das TGM, das stromaufwärts der BRE/TATA-Box lokalisiert, gebunden. Der genaue Mechanismus der Transkriptionsverstärkung ist zurzeit jedoch unklar. Ohne Ligand scheint TrmBL1 vor allem als Tetramer vorzuliegen. Durch Maltotriose oder Maltose wird eine Verschiebung zum Oktamer bewirkt. TrmBL1 besitzt jedoch im Vergleich zu TrmB nur zwei der sieben Zucker-bindenden Aminosäuren, was auf eine unterschiedliche Zuckerspezifität hinweist [Lee *et al.*, 2007b].

Als weiteres TrmB-like Protein wurde das 264 Aminosäure umfassende und 34 kDa große Protein TrmBL2 identifiziert. Aufgrund von Sequenzvergleichen (vgl. Abb. 3.1) wurde das Protein TrmBL2 der TrmB-Protein-Familie zugeordnet [Lee *et al.*, 2007b]. Es ist das am höchsten konservierte Mitglied der TrmB-Familie innerhalb der Ordnung *Thermococcales* (vgl. 3.2). Da für die bisher untersuchten TrmB-Proteine, TrmB und TrmBL1, wichtige Funktionen in der Regulation des Zuckermetabolismus erkannt wurden, wurde auch für TrmBL2 eine Beteiligung an der Regulation des Zuckerstoffwechsels postuliert [Lee *et al.*, 2008]. Jedoch zeigte ein Aminosäuresequenzvergleich von TrmBL2 (PF0496) aus *P. furiosus* mit TrmB und TrmBL1, einen trunkierten C-Terminus. Somit fehlen wichtige Teile der C-terminalen Zucker-Bindedomäne (vgl. Abb. 3.1). Daher war nicht klar, ob TrmBL2 in der Lage ist, Zucker zu binden. Es wurde über einen alternativen Mechanismus der TrmBL2-Aktivität spekuliert, wie er auch bei *E. coli* zu finden ist [Böhm und Boos, 2004, Lee *et al.*, 2008]. Dort kann der zentrale Aktivator aller *mal*-Gene, MalT, durch eine regulatorische Domäne von MalK kontrolliert werden. MalK ist eine Untereinheit des ABC-Transporters, die MalT bindet, solange keine Transportaktivität vorhanden ist. Bei Anwesenheit von Maltose löst sich MalT von MalK, welches somit als Regulator tätig werden kann [Böhm und Boos, 2004]. Dieselbe Domäne wurde auch in den Untereinheiten der TM- und MD-ABC-Transporter gefunden. Diese Domäne könnte demnach die TrmBL2-Aktivität regulieren. Die tatsächliche Funktion von TrmBL2 war zu Beginn dieser Arbeit unbekannt [Lee *et al.*, 2008].

Tabelle 3.2.: **Verbreitung von Proteinen der TrmB-Familie innerhalb der *Thermococcales*.** Die Proteine wurden mit ihrem jeweiligen Gennamen angegeben. In Klammern steht die Aminosäuresequenzidentität in Prozent im Vergleich zum jeweiligen Protein in *P. furiosus*. Nach [Lee *et al.*, 2007a]

	TrmB	TrmBL1	TrmBL2	TrmBL3	TrmBL4
<i>Pyrococcus furiosus</i>	PF1743	PF0124	PF0496	PF0661	-
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	PH1034 (71 %)	-	PH0799 (92 %)		PH0751
<i>Pyrococcus abyssi</i>	-	-	PAB0838 (91 %)	-	-
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	-	TK1769 (67 %)	TK0471 (82 %)	-	-

3.1.4. Zielsetzung

Ziel der Arbeiten war die Klärung inwieweit TrmBL2 ein globaler Transkriptionsregulator des Zuckermetabolismus ist. Die Aufklärung der Funktion von TrmBL2 bei *P. furiosus* sollte analog zur Funktionsaufklärung von TrmBL1 bei *T. kodakarensis* erfolgen [Kanai *et al.*, 2007]. Durch die Erzeugung einer TrmBL2-Deletionsmutante von *P. furiosus* sollten bei Wachstumsanalysen phänotypische Unterschiede in Abhängigkeit zum Wachstumssubstrat und der Kultivierungsbedingungen der Zellen ermittelt werden. Des Weiteren sollten durch Analysen der mRNA-Profile von wt *P. furiosus* und dem TrmBL2-Deletionsstamm Hinweise auf die durch TrmBL2 regulierten Gene erhalten werden. Durch *in vitro* Experimente mit rekombinant exprimiertem TrmBL2 sollten die, aus den *in vivo* Ansätzen generierten Ergebnisse bestätigt und die Charakterisierung der Funktion von TrmBL2 ergänzt werden. Zur Erzeugung der TrmBL2-Deletionsmutante und zur endogenen Expression von TrmBL2-His₆ in *P. furiosus* sollte auf die beschriebene Transformations-Methodik und die auf Antibiotika-Resistenz basierte Selektions-Strategie für *P. furiosus* zurückgegriffen werden. Im Fall der Deletionsmutante wird daher ein DNA-Konstrukt erstellt, bei dem die Simvastatin-Resistenzkassette zur Überexpression der HMGCR mit den im Genom flankierenden Regionen von *trmbl2* kombiniert wird. Durch die homologe Rekombination soll somit im Chromosom der Genbereich von *trmbl2* durch die Simvastatin-Resistenzkassette ersetzt werden. Zur Erzeugung einer 6xHistidin-TrmBL2-Fusion wird die DNA-Sequenz der Simvastatin-Resistenzkassette und des Histidin-Tags in einem Konstrukt mit dem kodierenden Bereich von *trmbl2* und genomisch flankierender Sequenz fusioniert. Die etablierten *P. furiosus* Stämme sollten anschließend für die dargestellten Analysen eingesetzt werden.

3.2. Material und Methoden

Alle weiteren verwendeten Materialien und Methoden sind im Kapitel 'Standard-Methoden und Materialien' (Anhang 1.1) gelistet. Die erzeugten Plasmide und Mutanten wurden in die Klonbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Regensburg aufgenommen. Die durch DNA-Sequenzierung verifizierten Nukleotidabfolgen der erzeugten Plasmide und Mutanten wurden digital am Lehrstuhl für Mikrobiologie hinterlegt.

3.2.1. Bakterien- und Archaeenstämme

Stamm	Klonnummer	Merkmal/Hersteller
<i>Pyrococcus furiosus</i>		DSMZ 3638
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MURPf6	Δ TrmBL2
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MURPf10	Expression TrmBL2 _{His6}

3.2.2. Erzeugte Plasmide

Plasmid	Klonnummer	Merkmal/Hersteller
pUC19 Δ TrmBL2	pMUR61	Deletion des Genlokus <i>pf0496</i>
pUC19 TKSImR	pMUR62	Simvastatin-Resistenzkassette aus <i>T. kodakarensis</i>

3.2.3. DNA-Manipulationen und Plasmid-Konstruktionen

MURPf6 Eine *pf0496*-Deletionsmutante wurde erstellt, bei der das Gen für TrmBL2 durch eine zusätzliche Genkopie zur Überexpression der HMGCR substituiert wurde. Um die homologe Rekombination des Konstruktes ins Genom zu gewährleisten, wurde die Simvastatin-Resistenzkassette (*tk0914*) mit etwa 1000 bp langen Fragmenten des stromaufwärts und stromabwärts flankierenden chromosomalen Bereiches von *pf0496* fusioniert. Zur Vermeidung von Rekombinationsereignissen im Markergenbereich wurde auf das *hmgcr*-Gen aus *T. kodakarensis*, *tk0914*, zurückgegriffen. Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, erfolgte die Amplifikation der drei Fragmente mit den Primerkombinationen Nr. 1+2 und 5+6 aus genomischer DNA aus *P. furiosus*. Die Simvastatin-Resistenzkassette wurde aus dem Plasmid pMUR62 (pUC19 TKSImR; Resistenzkassette mit Promotor- und Terminatorsequenz der *gdh*, sowie dem *hmgcr*-Genbereich aus *T. kodakarensis*) mit dem Primerpaar 3+4 amplifiziert. Nach der Fusion der einzelnen Fragmente mittels Überhang-PCRs (Anhang 1.1) und den Primern Nr. 1+4 wurde das gesamte Konstrukt über zusätzliche *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen in pUC19 integriert (Anhang 1.1). Der Vektor wurde in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert (Anhang 1.1) und erhaltene Kolonien mittels Kolonie-PCR (Anhang 1.1) selektiert. Anschließend erfolgte die Isolierung des Plasmids (Anhang 1.1) und eine Überprüfung durch Restriktionshydrolyse und DNA-Sequenzierung (Daten nicht gezeigt). Für die Transformation in *P. furiosus* wurde das Plasmid einer Restriktionshydrolyse mit *Bam*HI unterzogen (Anhang 1.1).

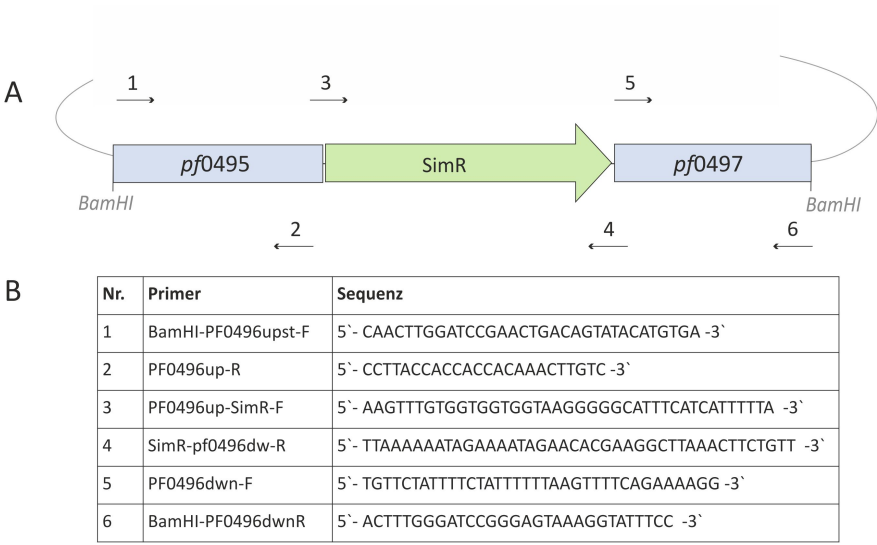


Abbildung 3.2.: **Konstruktion des Plasmids pMUR61.** A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung) und Restriktionsschnittstellen. Die Simvastatin-Resistenzkassette ist als hellgrüner Pfeil dargestellt. Die homologen Sequenzen für die Rekombination ins Genom sind als hellblaue Rechtecke abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

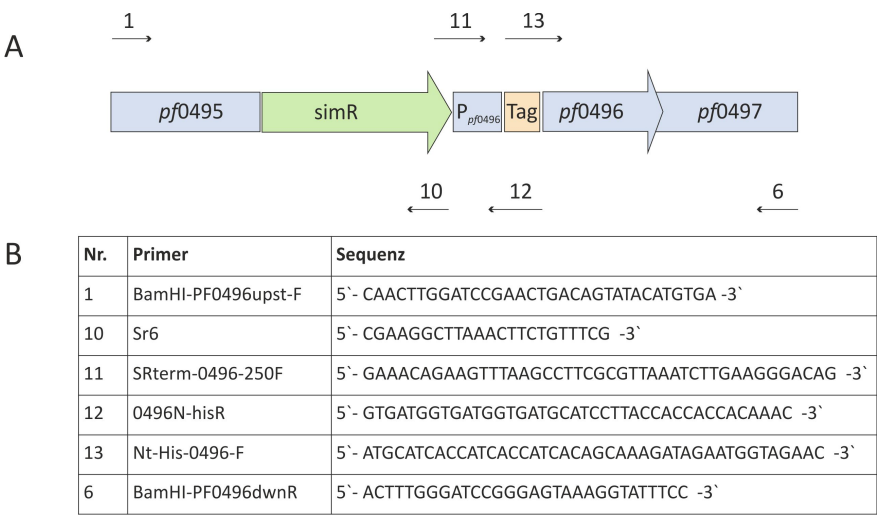


Abbildung 3.3.: **DNA-Konstrukt zur Erzeugung von MURPf10.** A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung). Die Simvastatin-Resistenzkassette ist als hellgrüner Pfeil, Proteintags als hellrotes Rechteck dargestellt. Die homologen Sequenzen für die Rekombination ins Genom, sowie der endogene Promotorbereich sind als hellblaue Rechtecke und Pfeile abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

MURPf10 Bei der Etablierung einer *P. furiosus*-Mutante zur Expression von N-terminal His₆-getaggttem TrmBL2 wurde auf eine Zwischenklonierung des DNA-Fragmentes in pUC19 verzichtet. In analoger Weise zu pMUR61 wurden identische chromosomal flankierende Bereiche von *pf0496* verwendet, um in den Zellen die homologe Rekombination des Konstruktes zu ermöglichen. Das Plasmid pMUR61 wurde daher zur Amplifikation der Simvastatin-Resistenzkassette inklusive der Stromaufwärts-Sequenz von *pf0496* mit dem Primerpaar 1+10 verwendet (vgl. Abb. 3.3). Die Anreicherung der zwei übrigen Fragmente sowie die Integration der Proteintag-Sequenz erfolgte mittels PCR (Anhang 1.1) durch die Primerkombinationen Nr. 11+12 und 13+6 mit genomischer DNA aus *P. furiosus*. Die Fragmente wurden mit Überhang-PCRs (Anhang 1.1) mit dem Primerpaar 1+6 verbunden und das PCR-Produkt gereinigt und konzentriert (Qiagen PCR-Purification Kit, Hilden). Das gereinigte PCR-Produkt sowie der Vektor in linearisierter Form wurden durch Hitzeschock in *P. furiosus* transformiert (Anhang 1.3). Nach 40-stündiger Selektion in Flüssigmedium mit 10 μ M Simvastatin wurden die Zellen auf Gelrite-Vollmedium-Platten mit 10 μ M Simvastatin vereinzelt und Reinkulturen erstellt.

3.2.4. RNA-Expressionsanalyse

RNA-Isolation

Es wurden 20-ml-Kulturen von *P. furiosus* wt und Δ TrmBL2 auf beschriebenem Flüssigkulturmedium mit 0,2 % Stärke bei 95 °C gezogen (Anhang 1.3). Die synchron gewachsenen Zellen wurden bei einer Zelldichte von $1,0 \cdot 10^8$ Zellen/ml durch Zentrifugation geerntet, wobei für jeden Ansatz die Zellmasse aus 5 ml konzentriert wurde. Unter Anwendung des 'RNeasy Lipid Tissue Mini Kit' wurde die Total-RNA aus den Zellen isoliert und die Qualität sowie die Reinheit mit einem 'Total RNA Nano Chip' am Bioanalyzer (Agilent Technologies) verifiziert. Für die Analysen wurden RNAs verwendet, deren O.D. 260/280 Verhältnis zwischen 1,8 und 2,2 lag und deren RIN >7 war; die eingesetzte Menge betrug je 3 μ g.

<i>P. furiosus</i> RNA Isolat	OD _{260/280}	RIN (RNA Integrity Number)
Wildtyp A	1.92	7.5
Wildtyp B	1.87	7.1
Δ TrmBL2 A	1.93	8.2
Δ TrmBL2 B	1.88	7.8

Microarray Auswertung

Biochip-Design Für die Genexpressionsanalyse wurde der Geniom Biochip (Nr. P5573 8NCBI) verwendet. Zur Berechnung der Sondengestaltung wurde auf die Sequenzdaten von *P. furiosus* bei NCBI (National Center for Biotechnology Information) zurückgegriffen. Dabei wurden für jedes Gen maximal bis zu acht Longmere Capture Sonden (50 bp) berechnet und diese in zwei Replikaten auf dem Chip aufgebracht. (Durchführung durch die Firma febit biomed gmbh in Heidelberg).

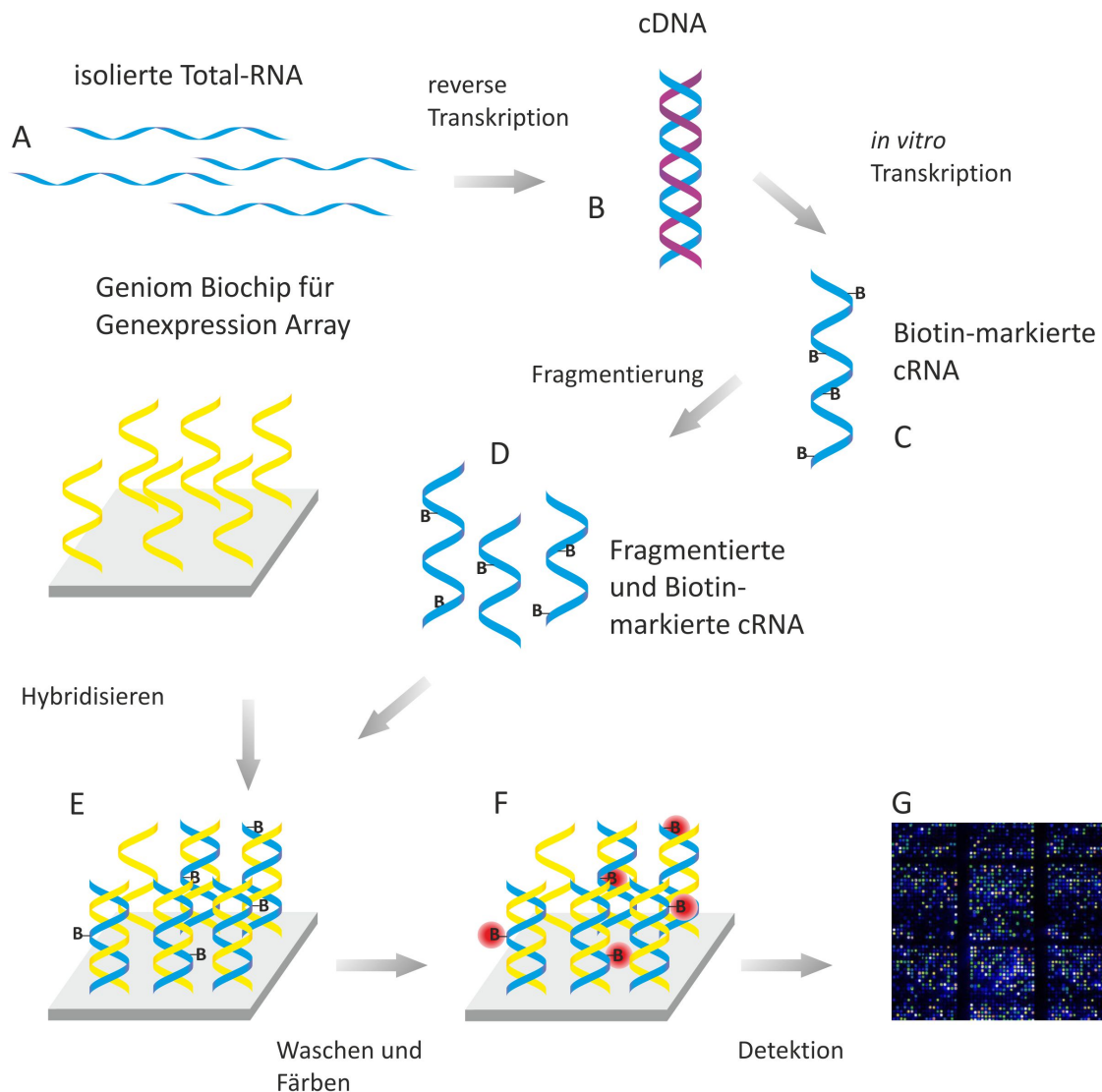


Abbildung 3.4.: Schematischer Überblick der Microarray mRNA-Profilierung Technologie. A) Die Total-RNA wird aus den zu untersuchenden Zellen isoliert. B) Die RNA wird durch reverse Transkription in stabile doppelsträngige cDNA umgeschrieben (und kann so bei Bedarf gelagert werden). C) Unmittelbar vor der Array-Hybridisierung wird die cDNA durch *in vitro* Transkription in RNA bzw cRNA umgesetzt, wobei simultan eine Markierung mit Biotin über modifizierte Uracil-Basen (Biotin-16-dUTP) stattfindet. D) Die markierte RNA wird in Fragmente einer Länge von 30 bis 400 bp geteilt. E) Hybridisierung der Biotin-markierten und fragmentierten RNA mit den komplementären Sonden auf dem Array. F) Durch Waschschritte werden ungebundene RNA-Fragmente entfernt. Danach wird der Array mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gefärbt (hier Cy3-konjugiertes Streptavidin). G) Zuletzt wird der Array mit einem Laser abgescannt und die Signale quantitativ analysiert.

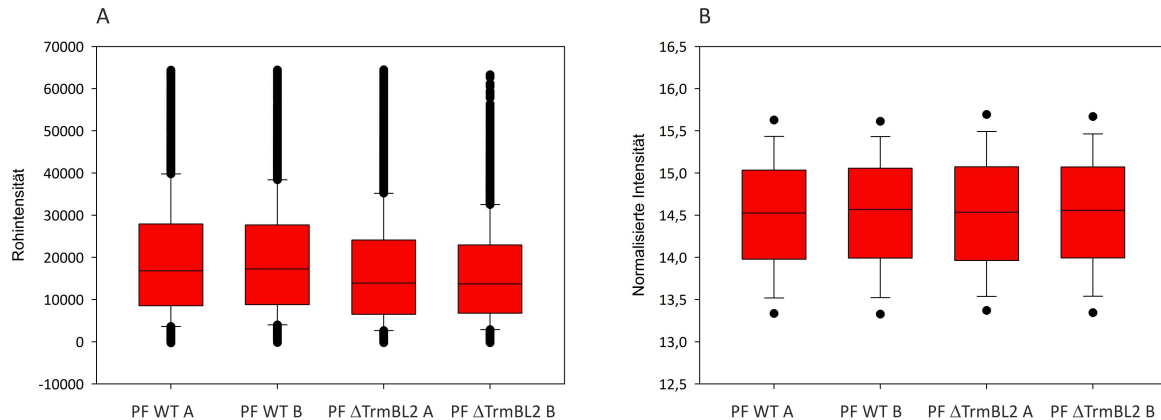


Abbildung 3.5.: **Normalisierung der Array-Rohdaten dargestellt in Boxplots.** Die Rohdaten (A) der Genexpressions-Arrays von *P. furiosus* WT und TrmBL2-Deletionsmutanten gewachsen auf Stärkemedium wurden (B) einer ‘variance stabilisation normalization’ (vsn) der Intensitäten und einer log-Transformation unterzogen (nach W. Huber [Huber *et al.*, 2002].)

Hybridisierung und Detektion Mit dem ‘MessageAmpTMII-Bacteria Kit’ von Ambion (Life Technologies GmbH, Darmstadt) wurde entsprechend den Hersteller-Angaben die RNA zuerst in cDNA und direkt im Anschluss in cRNA umgeschrieben und markiert. Pro Array wurde 1 μg markierter und fragmentierter RNA in 25 μl Hybridisierungspuffer bei 45 °C für 16 Stunden mit dem Biochip hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte voll automatisch im Geniom RT Analyzer und wurde von der febit gmbh in Heidelberg durchgeführt. Im Anschluss an einen Waschschriff wurden gebundene DNA-Sonden mit biotinylierten Nukleotiden markiert. Dabei nutzt bei dem 15 minütigen (37 °C) Primer Extention Ansatz das Klenow-Fragment die gebundenen mRNAs als Primer [Vorwerk *et al.*, 2008]. Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte die Detektion und Kalkulation des Biotins mit Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE)-Signals über den Cy3 Filter und die digitale Signal-Verstärkung (CSE) (Protokoll febit gmbh) voll automatisch. [Baum *et al.*, 2003, Summerer, 2009]. Die Rohdaten wurden mit Null- und Hybridisations-Kontrollen bereinigt. Abb. 3.4 gibt einen schematischen Überblick des Microarray-Verfahrens. (Von der Firma febit biomed gmbh (Heidelberg) durchgeführt. Die Serviceleistungen umfassten Array Design und Synthese sowie Fluoreszenzmarkierung der RNAs und zuletzt die Hybridisierung und Detektion der Sonden. Die generierten Rohdaten wurden übermittelt und sind am Lehrstuhl für Mikrobiologie hinterlegt.)

Auswertung und Statistik Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit GNU R und Software von Bioconductor (<http://bioconductor.org>) sowie dem ‘The Comprehensive R Archive Network’ (<http://cran.r-project.org>). Die Expressionsmessungen wurden wie beschrieben mit RMA (Robust Multichip Averaging) berechnet [Laubinger *et al.*, 2008]. Da das Mittel des gemessenen Hintergrunds der Biochips variiert, ist eine globale und lokale Hintergrund-Korrektur der Rohdaten notwendig. Diese wird automatisch von der ausführenden Messstation berechnet und vom Hintergrund der Rohdaten subtrahiert. Die hintergrundbereinigten Rohdaten dienen als Grundlage für alle folgenden Berechnungen.

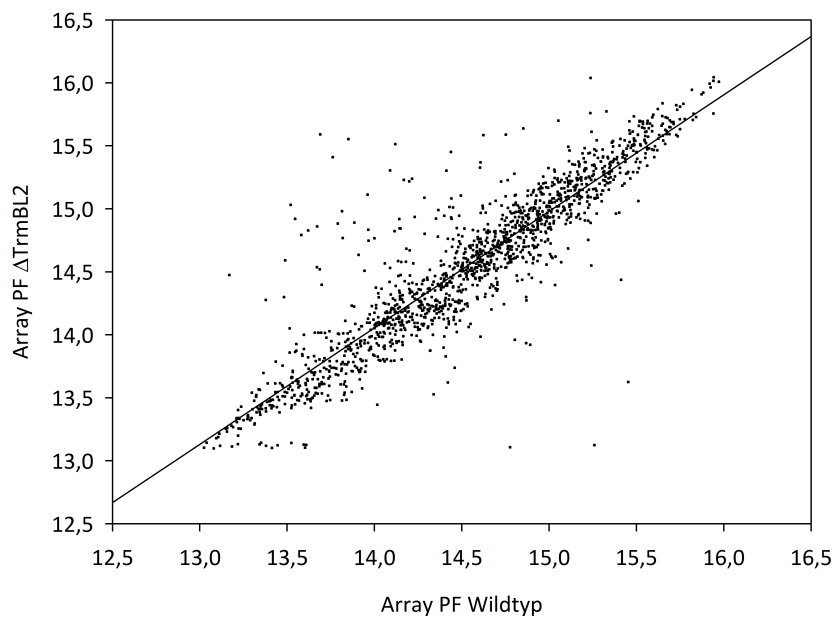


Abbildung 3.6.: **Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit der Microarray Replikate.** In einem Scatterblot wurden die erzeugten Daten der Arrays von wt *P. furiosus* und *P. furiosus* Δ TrmBL2 gegeneinander aufgetragen. Punkte stehen für die von jeder mRNA gemessene durchschnittliche Signalstärke der Sonden. Eingezeichnet ist zusätzlich die Regressionsgerade der Arraydaten.

Um die verschiedenen Arrays miteinander vergleichbar zu machen und den Einfluss der verfahrenstechnischen Abweichungen zu minimieren, wurden die Proben normalisiert. Es wurde die Varianz-stabilisierende Normalisierung (VSN) nach Huber [Huber *et al.*, 2002] angewendet und eine Log-Transformation der Daten durchgeführt. Diese ist notwendig, da durch die Einbeziehung der Distanzen bei der Durchschnittsberechnung quadratische Abhängigkeiten entstehen, die für eine natürliche, unabhängige Varianzverteilung nicht existieren (vgl. Abb. 3.5).

Anschließend wurden zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit, und somit der Qualität der Replikate, Scatterblotts mit den Arraydaten angefertigt (vgl. Abb. 3.6). Es wurden je die Arrays von *P. furiosus* Wildtyp und *P. furiosus* Δ TrmBL2 gegeneinander aufgetragen. Ideale Replikate liegen in der Winkelhalbierenden; die eingezeichnete Regressionsgerade weicht von dieser nur geringfügig ab, was für eine gute Reproduzierbarkeit der Daten spricht. Der berechnete Pearson Korrelationskoeffizient der Daten, welcher ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen ist, liegt bei 0,909 (0= kein bzw. +/-1= vollständiger linearer Zusammenhang). Die entfernt von der Winkelhalbierenden gelegenen Punkte entsprechen demnach den deregulierten mRNAs.

Des Weiteren wurden die Daten nach Pivot (R package 'reshape' von Wickham [Wickham, 2007]) entsprechend der Anzahl ihrer repräsentativen Sonden geordnet und alle Gene, die nur durch eine oder zwei Sonden vertreten waren, negativ selektiert. Anschließend wurden bei jedem Array für jedes Gen der Durchschnittswert der Sonden errechnet. Da aufgrund der geringen Probenzahl keine tiefere statistische Auswertung möglich war, fand eine weitere Sortierung der Daten über

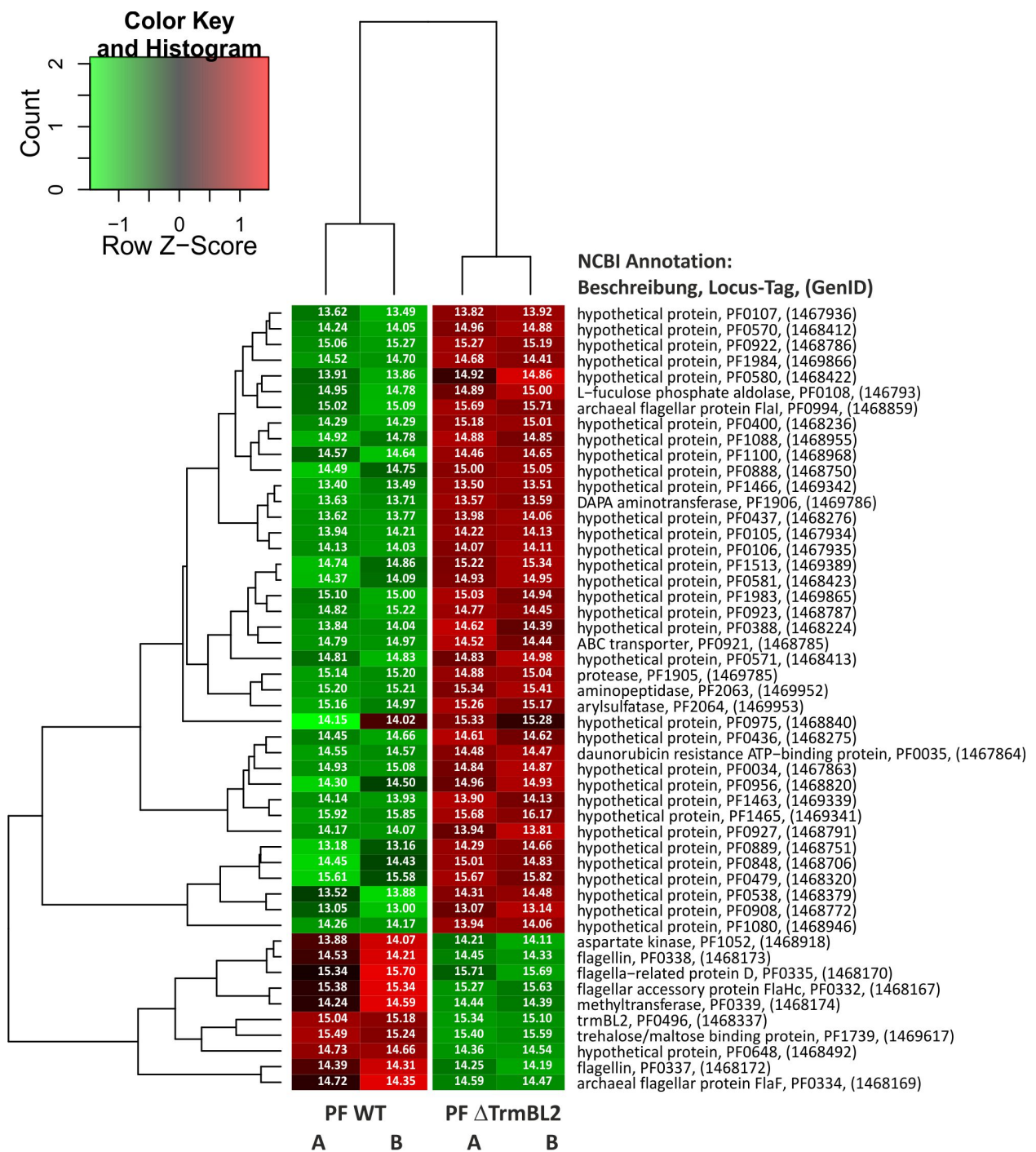


Abbildung 3.7.: Hierarchisches Cluster der verschiedenen stark exprimierten Gene in wt *P. furiosus* und der TrmBL2-Deletionsmutante. In dem Dendrogramm sind die 50 mRNAs mit der höchsten Gesamt-Variabilität zu sehen, nach ihrer Ähnlichkeit geordnet in Cluster. Die Heatmap repräsentiert die farbliche Darstellung der jeweiligen Sonden-Signalstärke der Gene innerhalb der zugeordneten Gruppe. Dabei steht rot für ein verstärktes Signal und grün für die Reduktion der Signalstärke; ausgehend von der Gruppenzuordnung, welche über Durchschnitt und Distanz der jeweiligen Signalstärken einer Gruppe errechnet wurde. Die errechneten Werte sind jeweils angegeben.

deren Distanzen statt. Für die weitere Analyse wurden nur Daten berücksichtigt, deren Distanz bei den Arrays innerhalb der Gruppe signifikant kleiner war, als zwischen den verschiedenen Gruppen. Genauer, deren Distanz zum Wert des Replikates kleiner war als die halbe Distanz der Verteilung der Gesamtwerte derselben Gruppe (25 % cut off). Aus diesen Werten wurde ein hierarchisches Cluster aufgrund ähnlicher Muster bzw. geringer Distanzen der Signalwerte mit Gruppen aus einander ähnlichen Genen erstellt (vgl. Abb. 3.7). Cluster bestehen also aus Objekten, die zueinander eine höhere Ähnlichkeit aufweisen als zu den Objekten anderer Cluster. Das hierarchische Cluster wurde durch die Berechnung der Euklidischen Distanz als Maßstab der Ähnlichkeit errechnet, wobei als Berechnungsvorschrift das agglomerative 'Complete-Linkage' Clusterverfahren („Bottom-up-Verfahren“) verwendet wurde. Eine Zusammenfassung ist in Form einer Tabelle mit den zehn Genen, welche die stärksten Unterschiede in ihrer Expression aufwiesen, gegeben (vgl. Tab. 3.4).

3.2.5. Chip-seq

Für eine detailliertere Einsicht in die verwendeten Protokolle und Puffer dienen neben der folgenden Beschreibung die Dissertation von Robert Reichelt (Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, 2014) und alle weiteren genannten Arbeiten.

Durch Formaldehydbehandlung einer wachsenden *P. furiosus*-Kultur (siehe auch Anhang 1.3) werden Protein-Protein- und Protein-DNA-Komplexe in den Zellen kovalent miteinander vernetzt. Nach dem Zellaufschluss und dem Scheren der DNA werden die TrmBL2-DNA-Komplexe mit Antikörpern gegen TrmBL2 immunpräzipitiert und isoliert. Anschließend wird die Quervernetzung zwischen den Molekülen aufgehoben und die DNA aus den Ansätzen gereinigt. Die isolierten DNA-Fragmente werden mit spezifischen Adaptoren modifiziert und amplifiziert und können anschließend sequenziert werden. Dadurch lassen sich die Bindestellen von TrmBL2 im Genom unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen der Zellen bestimmen.

Formaldehyd-Fixierung von *P. furiosus*-Zellen

Es wurden in 15-Liter-Ansätzen Kulturen von wt *P. furiosus* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen im Fermenter erstellt. In diesem Fall wurden dementsprechend die Zellen bei 95 °C in dem beschriebenen Stärke- oder Pyruvat-Flüssigkulturmedium (mit reduzierter Organik-Zugabe) angezogen (Anhang 1.3). Bei einer Zelldichte von etwa $1,5 \cdot 10^8$ Zellen/ml wurden die Zellen mit 37%iger Formaldehydlösung (Endkonzentration 0,1 %) fixiert. 20 Sekunden nach Zugabe des Formaldehyds wurden 67 ml 2,5 M Glycin zugegeben, um die Quervernetzungsreaktion zu stoppen. Für Hitzeschock-Untersuchungen wurde die Fermentationstemperatur bei einer Zelldichte von etwa $1,0 \cdot 10^8$ Zellen/ml auf 105-108 °C erhöht. Die Fixierung erfolgte nach 30-minütiger Inkubation bei erhöhter Temperatur. Die fixierten Zellen wurden gekühlt, über eine Durchlaufzentrifuge (Heraeus) geerntet und bei -80 °C gelagert. Das Protokoll zur Formaldehyd-Fixierung folgt den Angaben von Gudrun Vierke [Vierke, 2007].

Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitations-Ansätze wurden entsprechende Zellmengen, meist 1 g, gewaschen (Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C in der Beckmann-Zentrifuge; JA 25.50 Rotor, 13.000 g) und eine Tablette Protease-Inhibitor zugefügt. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung für 12 x 30 Sekunden (Branson Sonifier, constant duty cycle, output control 2.5) lysiert und die DNA geschert. Die Zelltrümmer wurden pelletiert (siehe oben) und anschließend eine Hydrolyse der DNA mit Micrococcus-Nuklease vorgenommen (5 min bei 37 °C mit 8 U Micrococcus-Nuklease pro 100 µl Zellysate und CaCl₂ (Endkonzentration 10 mM)). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt. 2,5 µg Antikörper gegen TrmBL2 wurde an 25 µl magnetische Protein G-Partikel (Dynabeads) gekoppelt und diese anschließend in 500 µl (Konzentration eingestellt auf 30 ng/µl DNA) Rohextrakt von wt *P. furiosus* Stärke- oder Pyruvat-Zellen inkubiert (über Nacht bei 6 °C auf dem Schüttler). Mit einem MPS wurden die magnetischen Partikel anschließend pelletiert und nach Entfernung des Überstands die Partikel mit den Protein-DNA-Komplexen mit verschiedenen Waschpuffern gereinigt. Die Waschschrte erfolgten zweimal mit Lyse-Puffer, einmal mit Lyse-Puffer 500, mit LiCl-Detergenz-Waschpuffer und mit TE-Puffer. In jedem Waschpuffer wurde das Pellet resuspendiert und 5 Minuten geschüttelt. Nach dem letzten Waschschrte wurde das Pellet mit 100 µl Elutionspuffer versetzt und 15 Minuten bei 65 °C denaturiert. Nach einer Zentrifugation wurde der Vorgang mit 150 µl TE/0,67 % SDS wiederholt. Die Fixierung von Protein und DNA wurde durch Inkubation der Proben bei 65 °C über Nacht gelöst. Nach einem RNase I-Verdau (30 min bei 37 °C) wurden die enthaltenen DNA-Fragmente mit Silica-Säulchen ('PCR-Purification Kit von Qiagen', Hilden) gereinigt. Für eine ausführlichere Beschreibung der Durchführung sowie der verwendeten Puffer und Lösungen siehe die Diplomarbeit von Stefan Eisenschink [Eisenschink, 2010].

Lyse-Puffer: Desoxycholat 0,1 % (w/v), EDTA 1 mM, HEPES pH 7,5 50 mM, NaCl 140 mM, Triton X-100 1 % (v/v)

Lyse-Puffer 500: Desoxycholsäure 0,1 % (w/v), EDTA 1 mM, HEPES pH 7,5 50 mM, NaCl 500 mM, Triton X-100 1 % (v/v)

LiCl-Detergenz-Waschpuffer: Desoxycholsäure 0,5 % (w/v), EDTA 1 mM, LiCl 250 mM, Tris-HCl pH 7,0 10 mM, Nonidet-P40 0,5 % (v/v)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 0,1 mM

Elutionspuffer: EDTA 10 mM, SDS 1 % (w/v), Tris-HCl pH 8,0 50 mM

qPCR und Library Präparation

Die Qualität der DNA-Isolierung wurde über qPCRs mit verschiedenen Referenzamplikons geprüft, wobei jeweils auch immer Inputproben mit direkt aus dem Zellysate isolierter DNA eingesetzt wurden. Dabei wurde die Anreicherung von Promotorsequenzen von konstitutiv exprimierten Genen sowie spezifischen Genen und intergenischen Bereichen (für eine Berechnung des Hintergrundsignals) gleichermaßen getestet (vgl. Tab. 3.3). Demnach weist eine verstärkte Anreicherung eines Fragmentes durch die qPCR auf eine erhöhte Wechselwirkung des Proteins, wel-

ches spezifisch über einen Antikörper isoliert wurde, mit dem entsprechenden DNA-Abschnitt des Chromosoms hin. Die qPCR-Ansätze wurden mindestens in zweifacher Ausführung mit dem Bioline Kit SensiMix-Reaktionsmix nach Herstellerangaben angefertigt und die qPCRs im Cycler Rotor Gene 6000 von Corbett Life Sciences (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Getestet wurden verschiedene Verdünnungsstufen der isolierten DNA-Fragmente. Der Standard wurde aus den Inputproben mit einer Konzentration von 1 ng/ μ l sowie einer 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung davon angefertigt. Das PCR-Programm bestand aus einem Denaturierungsschritt für 3 Minuten bei 95 °C. Danach folgten 40 Zyklen, bestehend aus einem Denaturierungsschritt (30 sek, 95 °C), einem Hybridisierungsschritt (30 sek, 55 °C) und einem Elongationsschritt (60 sek, 72 °C). Abschließend wurde die Schmelzkurve der Amplikons ermittelt und danach das Verhältnis der Anreicherung zum Hintergrund berechnet, indem der Quotient aus dem gemittelten Messwert der jeweiligen Probe und dem Hintergrund berechnet wurde. Bei einer Anreicherung ist dieser Wert ungleich bzw. größer 1. Eine ausführlichere Beschreibung der Vorgehensweise findet sich in der Diplomarbeit von Stefan Eisenschink [Eisenschink, 2010].

Tabelle 3.3.: Liste der bei qPCRs verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Bereich/Funktion	Sequenz	Fragmentlänge
GDH-NewFn	Promotor	5'– TGAAAATGTTTGAGGAACACC –3'	212 bp
GDH-NewRn		5'– TTGGGCAGCTCTTTCAAGTT –3'	
Pf0496-Fd	Promotor	5'– TCTGAGATCTATTTGTGGTGAAGA –3'	163 bp
Pf0496-Rw		5'– CCACCACCACAACTTGTCA –3'	
Pf0287f	Promotor	5'– AGGATTTGAACCTCGGACCT –3'	121 bp
Pf0287r		5'– GACCAGAGAGCGCAAACCTTTA –3'	
Qpcrintergenic3f	keine Spezifikation	5'– CTGCGGTGATCCCAAATTAT –3'	92 bp
Qpcrintergenic3r		5'– GGGCATTGTGGAGAGAGAAA –3'	

Es wurden DNA-Bibliotheken der isolierten und gereinigten DNA-Fragmente erstellt. In einem ersten Schritt wurden die überhängenden 5'-Enden der präzipitierten DNA-Fragmente in einer T4 DNA-Polymerase-Reaktion aufgefüllt und gleichzeitig die überhängenden 3'-Enden entfernt, um DNA-Fragmente mit 'blunt ends' zu erzeugen. Für ein optimales Ergebnis wurden zu den 30 μ l DNA 5 μ l 10-fach T4 DNA-Polymerase-Puffer, 2,0 μ l dNTP Mix (10 mM), 1,0 μ l T4 DNA-Polymerase (3 U/ μ l), 1,0 μ l Klenow DNA Polymerase (5 U/ μ l) und 1,0 μ l T4 PNK (10 U/ μ l) gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben mit dem 'PCR-Purification Kit' (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt. Für die 3'-Adenylierung der DNA-Fragmente wurden zu den 34 μ l an gereinigter DNA 5 μ l Puffer der Kle-

now Polymerase, 10 μ l dATP (1 mM) und 1 μ l Klenow 5'-exo- (5U/ μ l) hinzugegeben. Die Ansätze wurden gemischt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze erneut mittels 'PCR-Purification Kit' (Qiagen, Hilden) gereinigt. Um die DNA-Fragmente an ihren Enden mit den Adaptoren zu verbinden, wird ein molares Verhältnis von Fragmenten (\approx 300 bp Länge) zu Adapter von 10:1 eingestellt. Als enzymatische Aktivität wird T4 DNA Ligase in entsprechend konzentriertem Ligationspuffer der T4 DNA Ligase zugesetzt. Nach Inkubation der Ansätze über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Ansätze erneut gereinigt. Die DNA-Fragmente wurden über die ligierten Adaptorsequenzen amplifiziert. Dazu wurden Primerpaare, welche identisch zu den Linkern sind, für eine Standard-PCR mit den DNA-Fragmenten eingesetzt. Nach 17 Syntheszyklen wurden die Amplikons wiederum gereinigt und gemessen (Nanodrop). Nach einer abschließenden Qualitätskontrolle werden die Fragmente mit einem HiScanSQ System sequenziert. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Galaxy Server (<http://galaxyproject.org/>). Die Durchführung erfolgte unter Anleitung von Robert Reichelt. Eine detaillierte Darstellung der Vorgehensweise ist in der Dissertation von Robert Reichelt (Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, 2014) zu finden.

3.3. Ergebnisse

Aufgrund der Homologien innerhalb der TrmB-Proteinfamilie wurde für das Protein TrmBL2 eine Funktion als Transkriptionsregulator im Zuckerstoffwechsel postuliert. Um diese These zu prüfen, wurden Ansätze unternommen, mittels Wachstumsanalysen phänotypische Unterschiede zwischen einer TrmBL2-Deletionsmutante und wt *P. furiosus* zu ermitteln. Des Weiteren sollten durch Microarray-Analysen die mRNA-Profile beider Zelltypen verglichen werden. Zusätzlich wurden auch durch Chip-seq Ansätze die DNA-Bindestellen von TrmBL2 ermittelt und analysiert. Neben der globalen Betrachtung des Effekts von TrmBL2 auf *P. furiosus* durch *in vivo* Analysen wurde zudem der Versuch unternommen durch rekombinant exprimiertes TrmBL2 bei *in vitro* Experimenten die Funktion des Proteins zu bestimmen. In EMSA-Gelretardierungs-Experimenten und *in vitro* Transkriptionsanalysen wurde die Wechselwirkung von TrmBL2 mit bestimmten DNA-Sequenzen charakterisiert und der spezifische Einfluss des Proteins bei den entsprechenden Transkriptionsanalysen ermittelt. In ersten Untersuchungen wurden Tests zur Hitzestabilität von TrmBL2 durchgeführt.

3.3.1. Etablierung der TrmBL2 modifizierten *P. furiosus* Stämme MURPf6 und MURPf10

MURPf6 und MURPf10. Es wurde durch homologe Rekombination sowohl eine *pf0496* Deletionsmutante als auch eine *P. furiosus* Mutante zur Expression von TrmBL2_{His6} erstellt. Wie in Abb. 3.8 dargestellt erfolgte das doppelte Crossing-Over an den flankierenden Sequenzen von *pf0496*. Im Fall der TrmBL2-Deletionsmutante wurde der kodierende Genbereich von TrmBL2 durch die Simvastatin-Resistenzkassette aus *T. kodakarensis* ersetzt. Zur Erstellung der N-terminal His₆-getaggten TrmBL2-Variante wurde die endogene TrmBL2-Sequenz um den Proteintag erweitert. Da zur Vermittlung der chromosomalen Veränderung auch hier die Simvastatin-Resistenz-

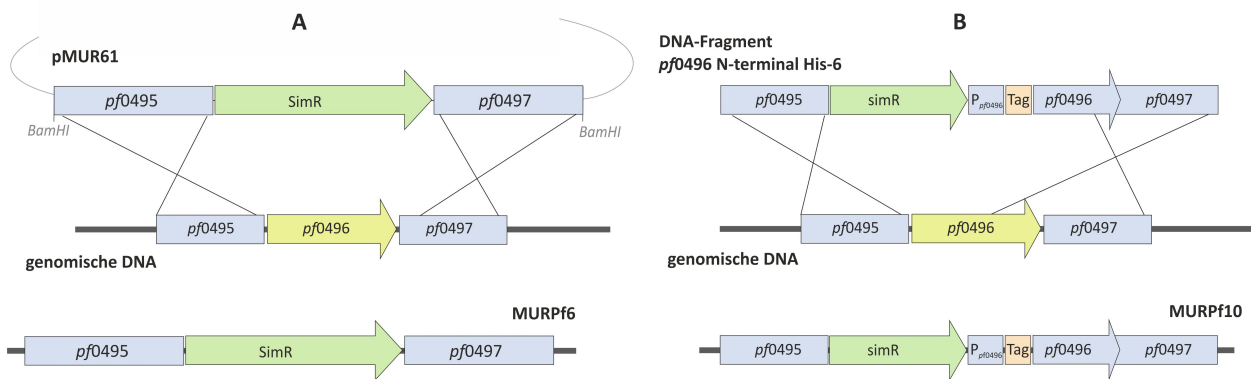


Abbildung 3.8.: Strategie zur Erzeugung von *P. furiosus* MURPf6 und MURPf10. Das durch Überhang-PCRs konstruierte Plasmid pMUR61 (A) sowie das PCR-Fragment (B) enthält zur homologen Rekombination die stromaufwärts- und stromabwärts flankierenden Sequenzen von *pf0496* (blau hinterlegte DNA-Bereiche) und das TK0914 Resistenzgen (grün hinterlegter Genbereich) zur Selektion mit Simvastatin. Der zusätzlich eingebrachte N-terminale Proteintag für TrmBL2 (B) ist in rot dargestellt. Durch Transformation und Selektion wurden die Stämme MURPf6 (A) und MURPf10 (B) erzeugt, bei denen *pf0496* (gelb hinterlegter Genbereich) durch das *tk0914*-Resistenzgen (bei B zusammen mit dem Proteintag von TrmBL2) substituiert wurde.

kassette Verwendung fand, wurde diese stromaufwärts vor dem *pf0496*-Genbereich platziert und der endogene Promotorbereich von *trmbl2* zwischen Resistenzkassette und TrmBL2-Genbereich gestellt. Die Kontrolle und Regulation des Expressionsniveaus von TrmBL2 bleibt damit unverändert. Aus einer daraus angefertigten Reinkultur wurde genomische DNA isoliert und über PCR die Komposition der veränderten Chromosomenabschnitte analysiert. Dabei wurden Primer, die innerhalb des Genbereichs von *pf0496* bzw. *tk0914* liegen, mit Primern, die außerhalb der veränderten Region binden, kombiniert (Oligonukleotide 3.2). Die durch wt *P. furiosus*-DNA und Mutanten-DNA erhaltenen Amplikons wurden miteinander und mit den erwarteten Fragmentgrößen verglichen. Zusätzlich wurden bei der TrmBL2-Deletionsmutante Southern Blot und Western Blot Analysen durchgeführt, um das Fehlen von TrmBL2 in den Zellen sowohl auf DNA- als auch Proteinebene zu verifizieren.

Southern Blot. Für den Southern Blot ('Standard-Methoden und Materialien' 1.1) wurde (mit den Primern 7+8) ein Teilfragment der *trmbl2* DNA-Sequenz über PCR amplifiziert und dieses zur Erzeugung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde eingesetzt. Isolierte gDNAs aus wt *P. furiosus* und der Deletionsmutante wurden in der Folge isoliert, einer Restriktionshydrolyse unterzogen und nach der Elektrophorese auf eine Membran übertragen. Durch die Hybridisierung der denaturierten DNA-Fragmente mit der Digoxigenin-markierten *trmbl2* DNA-Sonde sowie einer Sonde gegen das Gen der *hmgcr* aus *T. kodakarensis* konnte die Sequenz spezifisch bei wt *P. furiosus* nachgewiesen werden, während der Bereich bei der Deletionsmutante fehlt (vgl. Abb. 3.9).

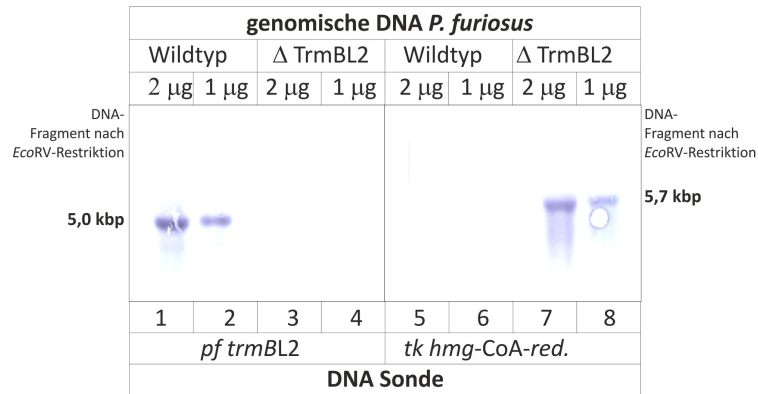


Abbildung 3.9.: Verifizierung der TrmBL2-Deletionsmutante durch Southern Blot. Mittels Digoxigeninmarkierter DNA-Sonden gegen Sequenzbereiche innerhalb von *trmbl2* und der *hmgcr* wurde die chromosomale Komposition der *P. furiosus*-Mutante untersucht. Während die Sequenz von *trmbl2* in der genomischen DNA von wt *P. furiosus* nachgewiesen werden kann (Spuren 1 und 2) fehlt das entsprechende Signal bei der Deletionsmutante. Dafür erscheint bei der Mutante an der Position des entsprechenden DNA-Fragments das Signal für den Nachweis des Simvastatin-Resistenzgens aus *T. kodakarensis* (Spuren 7 und 8), welches als Selektionsmarker verwendet wurde. Diese Sequenz fehlt folglich beim wt *P. furiosus* (Spuren 5 und 6).

Western Blot. Bezüglich der Western Blot-Untersuchung (Anhang 1.2) wurden Rohextrakte von *P. furiosus* Wildtyp und *P. furiosus* TrmBL2_{His6} hergestellt und nach der elektrophoretischen Trennung auf eine Membran übertragen. Zur Detektion wurden Antikörper gegen TrmBL2 eingesetzt, welche wiederum von sekundären, fluoreszenz-markierten Antikörpern gebunden werden. Die Expression des TrmBL2_{His6} wurde durch die Isolierung der getaggtten Proteine aus der Rein- kultur mit magnetischen Ni-NTA-Beads (Dynabeads) mit anschließender PAGE und Coomassie- Färbung kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Somit konnte nachgewiesen werden, dass, wie ge- wünscht, *pf0496* im Genom von *P. furiosus* durch beschriebene Sequenzen substituiert und *P. furio- sus* ΔTrmBL2 bzw. *P. furiosus* TrmBL2_{His6} generiert wurden.

TrmBL2_{His6}-Reinigung. Der verifizierte Stamm *P. furiosus* TrmBL2_{His6} wurde zur Kultivierung in Fermentern eingesetzt, um Zellmasse für die Isolierung des Proteins zu erzeugen. Die Züchtun- gen fanden im Flüssigkulturmedium mit den Substraten 0,4 % Pyruvat, 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Pepton und 10 µM Simvastatin bei 85 °C statt (Anhang 1.3). Aus dem so erhaltenen Zellmateri- al wurde Rohextrakt für die Proteinreinigung hergestellt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch ei- ne Kombination aus Ultraschallbehandlung und Glasbeads. Die Rohextrakte wurden einer DNase I- Behandlung unterzogen und größere Zellreste durch Ultrazentrifugation entfernt. Ein detail- liertes Protokoll der Erstellung der Rohextrakte für Proteinreinigungen mittels Ni-NTA befindet sich im Kapitel 'Standard-Methoden und Materialien' (1.2). Die chromatographische Reinigung des 6xHis-TrmBL2- Fusionen fand nach dem früher beschriebenen Schema, mit Hilfe des Zwei- Schritte-Reinigungsprotokolls, bestehend aus Ni-NTA-Affinitäts- und anschließende Gelfiltrations- Chromatographie, statt (Anhang 1.2). Abschließend wurden die Fraktionen an gereinigtem Trm- BL2 vereint und mittels Vivaspin20 (MWCO 30000, Sartorius) angereichert und nach der Konzen- trationsbestimmung bei -80 °C gelagert.

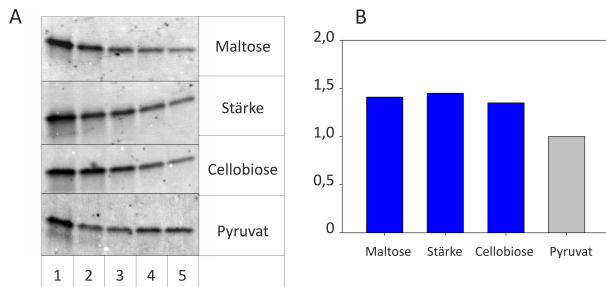


Abbildung 3.10.: Das Expressionsniveau von TrmBL2 ist nur geringfügig abhängig vom Substrat der Zellen. A) Anteil an TrmBL2 in den Zellen, bestimmt mittels spezifischen AK. Verwendet wurden synchron identisch kultivierte und präparierte Zellysate von wt *P. furiosus* Zellen gewachsen in Flüssigkulturmedium mit Stärke, Pyruvat, Maltose oder Cellobiose als Substrat. Von Spur 1 bis 5 verdoppelt sich je das Volumen an eingesetztem Zellysat. Normalisiert wurden die Zellysate über Western Blots gegen die RpoD Untereinheit der RNAP (nicht gezeigt). B) Faktor des Produktionsniveaus von TrmBL2 bei Zellen, welche auf Maltose, Stärke oder Cellobiose (blaue Balken) kultiviert wurden im Vergleich zum Level bei Zellen die auf Pyruvat (grauer Balken) kultiviert wurden.

3.3.2. *In vivo* Charakterisierung von TrmBL2

Abhängigkeit des Produktionsniveaus von TrmBL2 vom Substrat der Zellen. Der Gehalt an TrmBL2 in Pyruvat- oder Stärke- gewachsenen Zellen wurde untersucht. Durchgeführte Western Blot Analysen mit Rohextrakten von glykolytisch und gluconeogenetisch gewachsenen wt *P. furiosus* Zellen deuten auf ein etwas unterschiedliches Expressionslevel von TrmBL2 in Abhängigkeit vom Substrat hin. Für diese Analyse wurde strikt auf die Betrachtung vergleichbarer Wachstumsstadien der Zellen geachtet. Hierfür wurden die *P. furiosus*-Zellen jeweils in den verschiedenen Substraten synchronisiert und je 200 ml Flüssigkulturmedium analog beimpft, inkubiert und bei einer Zelldichte von $1,0 \cdot 10^8$ die Zellen geerntet. Die Western Blot Analyse erfolgte nach beschriebenen Protokoll (Anhang 1.2). Wie in Abb. 3.10 zu sehen, ist der Gehalt an TrmBL2 in Zellen die auf Stärke, Pyruvat, Cellobiose oder Maltose als Substrat gewachsen sind, verschieden. Im Vergleich zu Pyruvat ist der produzierte TrmBL2 Anteil bei Kultivierung auf Maltose und Cellobiose um den Faktor 1,3, bzw. bei Kultivierung auf Stärke um den Faktor 1,45 erhöht.

Wachstumsanalysen mit wt *P. furiosus* und MURPf6. Um eine eventuelle Beteiligung von TrmBL2 am Zuckerstoffwechsel charakterisieren zu können, wurden Wachstumsanalysen von wt *P. furiosus* und dem *P. furiosus* Δ TrmBL2-Stamm in verschiedenen, glykolytischen und gluconeogenischen, Kulturmedien durchgeführt. Dazu wurden die Kulturen stufenweise an die auf SME-basierenden Flüssigkulturmedien mit je 0,025 % Hefeextrakt sowie wahlweise 0,2 % Stärke, Na-Pyruvat, Cellobiose oder Maltose adaptiert. Die Konzentration an Organika im Flüssigmedium wurde reduziert, um den Anteil an unbeabsichtigt eingebrachten Zuckern zu reduzieren. Nach der Anpassung an die Kultivierungsbedingungen wurde zudem für die Herstellung der synchronisierten Vorkulturen auf die Beigabe von Simvastatin verzichtet. Die Komposition des Genlocus von *trmbl2* wurde vor und nach den Wachstumsanalysen durch PCR mit isolierter gDNA kontrolliert (Anhang 1.1). Es wurden für jedes Substrat analog je drei Ansätze in 20 ml Medium durchgeführt und für die Erstellung der Wachstumskurve die Mittelwerte der Zellzahlen berechnet. Die Kulturen wurden je mit einer Ausgangszelldichte von etwa $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml beimpft und

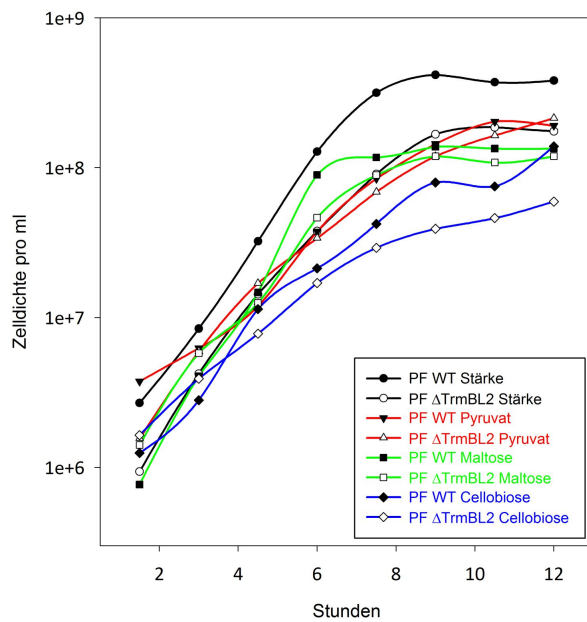


Abbildung 3.11.: Vergleich des Wachstums von wt *P. furiosus* (●) und TrmBL2-Deletionsmutante (○) auf verschiedenen Substraten. Gezeigt sind jeweils die aus Tripletansätzen erhaltenen Mittelwerte. Die Versuche wurden bei 95 °C in 20-ml-Serumflaschen durchgeführt. Die auf 1/2 SME basierenden anaeroben Medien enthielten neben den angegebenen Substraten je 0,025 % Hefeextrakt.

die Entwicklung der Zellzahlen bei 85 °C und 95 °C über 12 Stunden verfolgt und festgehalten. Die Berechnung der Zelldichten in den Kulturen erfolgte mittels Thoma-Zählkammer (0,02 nm Tiefe; Marienfeld, Lauda-Königshofen) und Phasenkontrast-Mikroskopie. In Abb. 3.11 zu sehen sind die bei 95 °C erhaltenen Wachstumsmuster von *P. furiosus* Wildtyp (●) und Deletionsmutante (○) für die Substrate Stärke (schwarze Linien), Pyruvat (rote Linien), Cellobiose (blaue Linien) und Maltose (grüne Linien). Das Wachstum der *P. furiosus* Stämme differiert nicht wesentlich. Bei dem Substrat Stärke wurde ein Wachstumsvorteil von wt *P. furiosus* gegenüber der TrmBL2-Deletionsmutante beobachtet. Während wt *P. furiosus* eine Zelldichte von $4,1 \cdot 10^8$ erreichte, wurde bei *P. furiosus* ΔTrmBL2 eine maximale Zelldichte von $1,9 \cdot 10^8$ erzielt. Generell waren die maximal erreichten Zelldichten durch die Reduktion der organischen Zusätze vermindert und zusätzlich auch bei 85 °C die Generationszeit im Vergleich zu 95 °C verlängert. Insgesamt scheint der Einfluss der Substratwahl auf das Wachstum größer zu sein, als die Auswirkungen der Deletion von TrmBL2 bei *P. furiosus*. Somit können in Abb. 3.11 für das Wachstum auf Cellobiose (blaue Linien) insgesamt deutlich verminderte Werte sowohl für den Wildtyp (maximale Zelldichte $1,4 \cdot 10^8$) als auch die TrmBL2-Deletionsmutante (maximale Zelldichte $6,0 \cdot 10^7$) im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten bestimmt werden. Jedoch waren auch in diesem Fall die Unterschiede bei 85 °C weit geringer bzw. die Zelldichten der Deletionsmutante waren höher als die des wt *P. furiosus*. Somit konnten keine signifikanten, phänotypischen Merkmale des Wachstumsverhaltens der Deletionsmutante bestimmt werden. Dennoch kann ein gewisser Einfluss der TrmBL2-Deletion auf das Wachstum der Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Genexpressionsanalyse. Durch die Untersuchung und den Vergleich des Transkriptoms der Zellen sollten nun Erkenntnisse über die regulatorische Funktion von TrmBL2 bezüglich der RNA-Synthese erlangt werden. Dazu wurden 20-ml-Kulturen von wt *P. furiosus* und ΔTrmBL2, gezogen auf beschriebenen Flüssigkulturmedien mit 0,2 % Stärke bei 95 °C, angefertigt. Die synchron

3.3. Ergebnisse

Tabelle 3.4.: **Ergebnis der Genexpressionsanalysen von *P. furiosus* Wildtyp und Δ TrmBL2.** Gezeigt sind die 10 Gene mit der größten gemessenen Differenz an Signalstärke zwischen den Stämmen.

Beschreibung, Locus-Tag, (GenID)	log-fold change	fold chage	ØWildtyp	ØΔTrmBL2
hypoth. Protein, PF0889, (1468751)	3,69	1,31	13,17	14,48
hypoth. Protein, PF0975, (1468840)	3,39	1,22	14,09	15,31
hypoth. Protein, PF0580, (1468422)	2,73	1,01	13,89	14,89
hypoth. Protein, PF0400, (1468236)	2,24	0,81	14,29	15,10
hypoth. Protein, PF0570, (1468412)	2,17	0,78	14,15	14,92
hypoth. Protein, PF0581, (1468423)	2,03	0,71	14,23	14,94
hypoth. Protein, PF0538, (1468379)	2,00	0,70	13,70	14,40
arch. Flagellen Protein FlaI, PF0994, (1468859)	1,91	0,65	15,06	15,70
hypoth. Protein, PF0388, (1468224)	1,76	0,57	13,94	14,51
hypoth. Protein, PF0956, (1468820)	1,72	0,55	14,40	14,95

gewachsenen Zellen wurden bei einer Zelldichte von $1,0 \cdot 10^8$ Zellen/ml durch Zentrifugation geerntet und die Total-RNA aus den Zellen isoliert. Die Analysen der RNAs wurden kommerziell auf einem Geniom Biochip für *Pyrococcus* mRNA (Nr. P5573 8NCBI) von der Firma febit biomed gmbh (Heidelberg) durchgeführt. Wie unter 3.2.4 detailliert beschrieben, wurden die Rohdaten einer Varianz-stabilisierenden Normalisierung (VSN, [Huber *et al.*, 2002]) unterzogen (vgl. Abb. 3.5) und zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit und somit der Qualität der Replikate, Scatterblotts mit den Arraydaten angefertigt (vgl. Abb. 3.6). Hierfür wurden die Arrays von *P. furiosus* Wildtyp und *P. furiosus* Δ TrmBL2 gegeneinander aufgetragen und die Korrelation der Werte ermittelt. Zuletzt wurden die transformierten Arraydaten geclustert und somit über deren Signalwerte Gruppen aus einander ähnlichen Genen erstellt (Details der Berechnungsvorschrift befinden sich im Abschnitt 'Material und Methoden' auf Seite 3.2.4). Das Ergebnis ist als Dendrogramm mit Heatmap (vgl. Abb. 3.7) der 50 mRNAs mit der höchsten gesamt Variabilität zu sehen. Eine Zusammenfassung ist in Form einer Tabelle mit den zehn Genen, welche die stärksten Unterschiede in ihrer Expression aufwiesen, gegeben (vgl. Tab. 3.4). Wie aus Tabelle 3.4 hervorgeht wurden nur marginale Unterschiede im mRNA-Profil der wt-Zellen und der Deletionsmutante detektiert. Es konnte kein Zusammenhang der Deletion von TrmBL2 mit der De-Regulation von Enzymen des Zucker-

stoffwechsels nachgewiesen werden. Ferner gibt es keine Unterschiede bezüglich der gemessenen mRNA-Intensitäten zwischen den Gruppen. Wenn TrmBL2 ein potentieller Transkriptionsfaktor wäre, müsste ein größerer Unterschied in der Expression der deregulierten mRNAs zwischen wt-Zellen und der Deletionsmutante beobachtet werden. Ein Großteil der ermittelten mRNAs kodieren für Proteine die heute als 'hypothetisch' annotiert sind. Um dennoch einen Hinweis auf ein potentielles Funktionsgebiet zu erlangen, wurden vorhandene konservierte Domänen untersucht, um eventuell die Aktivität des Proteins ableiten zu können. Dabei erwiesen sich die möglichen Funktionen der ermittelten Proteine als breit gefächert und wenig spezifisch. Eine Funktion im Zuckerstoffwechsel konnte nicht ermittelt werden. Insgesamt muss erwähnt werden, dass Microarray-Analysen durch eventuelle cross-Hybridisierungen der Sonden und Hintergrundsignale limitiert werden. Essentiell für die Qualität der Analyse ist das Design der Sonden, welches in diesem Fall auch aufgrund fehlender Erfahrung und des geringen kommerziellen Bedarfs an *Pyrococcus* Biochips nicht optimal war. Allein der Informationsverlust durch den Ausschluss von Genen die nur durch eine einzige Sonde repräsentiert wurden, war 25 % .

Proteomanalyse. Des Weiteren wurden zum Vergleich auch Proteomanalysen des *P. furiosus* Wildtyps und der TrmBL2-Deletionsmutante vorgenommen (durchgeführt von AG Prof. Dr. Rainer Deutzmann). Hierfür wurden Rohextrakte der entsprechenden Zelltypen, gewachsen auf Stärkemedium, angefertigt und die gesamte zelluläre Proteinfraction über 2D-PAGE getrennt. Nach der Färbung der Proteine wurden über den direkten Vergleich der Verteilungsmuster Veränderungen der Proteinzusammensetzung bestimmt. Die zwischen den Zelltypen variierenden Proteinspots wurden massenspektrometrisch über MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) charakterisiert (Daten nicht gezeigt). Auch dieser Ansatz zur Identifizierung von Unterschieden zwischen wt *P. furiosus* und TrmBL2-Deletionsmutante brachte keine Erkenntnisse. Zwar gab es im Proteom der Stämme Unterschiede der Expressionsmuster einiger Proteine, jedoch konnten entsprechende Proteine keiner Funktion im Zuckerstoffwechsel zugeordnet werden. Auch der Abgleich mit den Microarray mRNA-Genexpressionsergebnissen brachte keine Übereinstimmung zu potentiellen Zielgenen von TrmBL2. Jedoch existieren zwischen dem mRNA-Level eines Gens und dem resultierenden Protein verschiedene mögliche Regulations- und Modifikationswege, die bei Weitem noch nicht vollständig geklärt wurden. Daher muss nicht in jedem Fall ein direkter Zusammenhang von mRNA zu Proteinlevel in der Zelle bestehen.

Chromosomale DNA-Bindestellen. Zur abschließenden Kontrolle wurden schließlich TrmBL2 Chip-seq-Ansätze angefertigt, mit denen die Bindestellen von TrmBL2 am Chromosom unmittelbar bestimmt werden. Über die Position der Bindestellen können regulierte Gene ermittelt werden. Für die Untersuchung wurden Kulturen von wt *P. furiosus* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen in Fermentern erstellt. In diesem Fall wurden die Zellen bei 95 °C in dem beschriebenen Stärke- oder Pyruvat-Flüssigkulturmedium (mit reduzierter Organik-Zugabe) angezogen. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert, durch Zentrifugation geerntet (3.2.5) und Rohextrakte mit geschehrter DNA präpariert. Über an magnetische Protein G-Partikel gekoppelte Antikörper gegen TrmBL2 wurde das Protein mit daran verlinkter DNA aus definierten Rohextrakt-Mengen

3.3. Ergebnisse

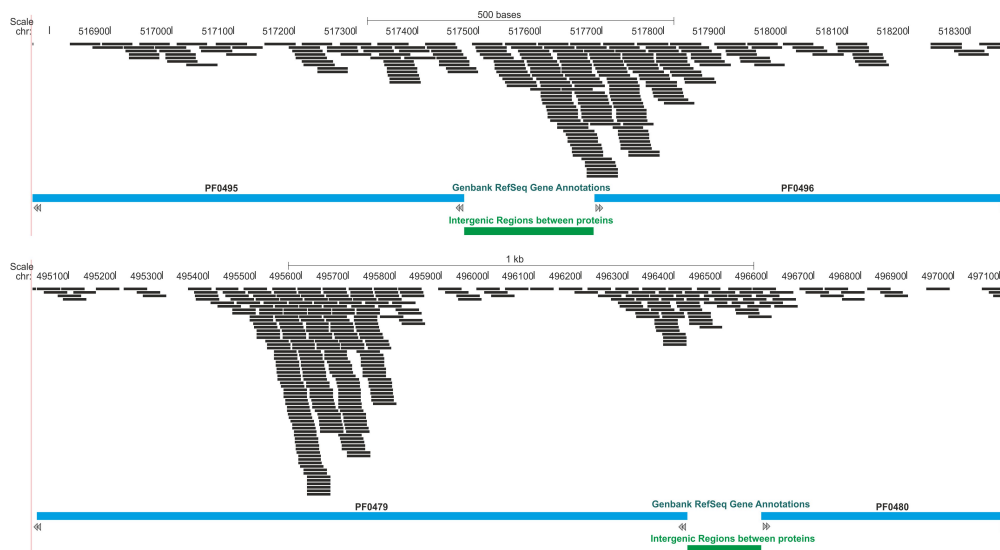


Abbildung 3.12.: Beispiele der Chip-seq-ermittelten Bindestellen von TrmBL2. Beispielhafte Veranschaulichung der bestimmten TrmBL2-Bindestellen in den Regionen *pf0496*, *pf0479* und *pf0339*. Die schwarzen Balken stellen die erhaltenen Sequenzen am Chromosom von *P. furiosus* dar. Kodierende DNA-Bereiche sind als blaue Balken wiedergegeben, der Genlocus mit Hilfe einer Sequenzleiste über den Bindestellen. Diejenigen Sequenzbereiche, die beim Chip-seq gehäuft bestimmt wurden, beinhalten TrmBL2 Bindestellen.

von wt *P. furiosus*, gewachsen auf Stärke oder Pyruvat, isoliert. Die Fixierung von Protein und DNA wurde durch Inkubation der Proben bei 65 °C gelöst und die enthaltenen DNA-Fragmente mit Silica-Säulchen gereinigt (3.2.5). Durch Adenylierung und Adapter-Ligation der Fragmente sowie deren Reinigung und Anreicherung wurden DNA-Bibliotheken erstellt (3.2.5). Die Fragmente wurden mit einem HiScanSQ System sequenziert und die Daten mit dem Galaxy Server (<http://galaxyproject.org/>) ausgewertet. Für eine detailliertere Einsicht in die verwendeten Protokolle und Puffer dient die Beschreibung der Durchführung im Abschnitt 'Materialien und Methoden' 3.2.5 sowie die Dissertation von Robert Reichelt (Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, 2014) und die Diplomarbeit von Stefan Eisenschink [Eisenschink, 2010]. In Abb. 3.12 sind Beispiele detektierter Bindestellen von TrmBL2 bei *P. furiosus* Wildtypzellen, die unter glykolytischen (Stärke-Kulturmedium) oder gluconeogenischen (Pyruvat-Kulturmedium) Bedingungen kultiviert wurden, wiedergegeben (aus graphischen Gründen wurde die Absolutmenge der in dieser Darstellung einbezogenen Sequenzen auf 10.000 beliebige von allen ermittelten Sequenzen reduziert). Insgesamt wurden bei Zellen, gewachsen auf Stärke und Pyruvat, aus allen erhaltenen Sequenzen 236 Bindestellen von TrmBL2 im Genom ermittelt (vgl. Tab. 3.5). Von diesen traten 153 gleichermaßen bei Stärke- und Pyruvat-Bedingungen auf. Lediglich elf Bindestellen traten spezifisch bei Pyruvat und 72 bei Stärke auf. Die Verteilung der Bindestellen von TrmBL2 lag bei 53 % im kodierenden bzw. transkribierten DNA-Bereich und 47 % in intergenischen und eventuell regulatorischen Sequenzen. Für das gesamte Chromosom betrachtet ist die Verteilung der TrmBL2-Bindestellen in Richtung der intergenischen Bereiche verschoben, da diese nur etwa 10 % des Chromosoms bilden und annähernd 90 % der Sequenz kodierend ist. Welche Faktoren die Bindesepezifität verursachen, ist unklar. Versuche, über die analysierten Bindestellen eine Konsen-

Tabelle 3.5.: Häufigkeit der chromosomalen TrmBL2-Bindestellen bei *P. furiosus*.

Bindestellen	Stärke	Pyruvat
Summe (Stärke + Pyruvat)		236
Gesamt	225	164
Spezifisch	72	11
Identisch		153
In kodierenden Sequenzen		125 (53 %)
In intergenischen Sequenzen		111 (47 %)

sussequenz der TrmBL2-Bindung zu errechnen, konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden. Somit konnte kein Bindemotiv identifiziert werden. Jedoch scheint es eine klare Präferenz der Bindung von TrmBL2 an AT-reiche Basensequenzen zu geben. Da besonders Promotor- und Terminationssequenzen AT-reich sind, ist TrmBL2 dort tendenziell häufiger zu finden; im Speziellen, wenn beide Bereiche direkt aneinander liegen. Mit den durchgeführten Analysen konnten keine Hinweise auf eine Funktion von TrmBL2 als Transkriptionsregulator mit spezifischer Beteiligung an der Regulation des Zuckerstoffwechsels gewonnen werden.

3.3.3. *In vitro* Funktionsanalyse von TrmBL2

Für eine weitere Charakterisierung der Funktion von TrmBL2 wurden *in vitro* Analysen mit dem gereinigten 6xHistidin-Fusionsprotein durchgeführt. Hierbei wurde zuerst das Bindungsverhalten von TrmBL2 an ausgewählte DNA-Sequenzen untersucht. Anschließend sollte der Effekt von TrmBL2 bei *in vitro* Transkriptionen an entsprechenden DNA-Matrizen geprüft werden.

Gelretardierungs Assays. Die EMSA-Ansätze (Anhang 1.1) mit TrmBL2 belegten, dass TrmBL2 grundsätzlich in der Lage ist, *in vitro* jede Art von DNA relativ unabhängig von der konkreten Sequenz zu binden. Alle für die Gelretardierungs-Experimente eingesetzten fluoreszenz-markierten DNA-Matrizen wurden von TrmBL2 gebunden. Wie auch in Abb. 3.13 zu sehen, wurde neben den in den Chip-seq-Analysen ermittelten Genbereichen auch die *gdh* Kontroll-Matrize gebunden (vgl. Abb. 3.13 A Spuren 5 und 6). Für das Gen der GDH existiert keine Information über einen Zusammenhang der Genexpression mit einer TrmBL2-Interaktion. Zusätzlich zeichnete sich bei keiner der Matrizen eine singuläre spezifische Shift-Bande durch TrmBL2 ab, sondern vielmehr ergaben sich komplexe Leiter-artige Bindemuster (vgl. Abb. 3.13 A Spuren 1 bis 4). Selbst bei Zugabe von reduzierten Mengen von TrmBL2 und in Anwesenheit einer hohen Menge an DNA-Kompetitor war nie ein singulärer Shift zu beobachten (vgl. Abb. 3.13 B), sondern vielmehr eine schwächere Version des komplexen Bindemusters. Dies könnte darauf hinweisen, dass TrmBL2

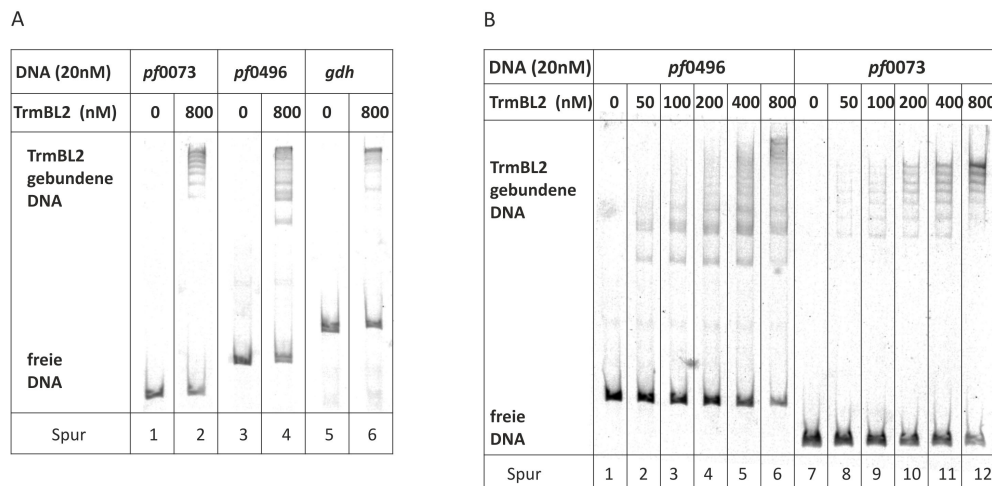


Abbildung 3.13.: DNA Bindeaktivität von TrmBL2 in Gelretardierungs Elektrophoreticmobility-Shift Assays. EMSA-Experimente mit verschiedenen DNA-Matrizen wurden durchgeführt, wobei TrmBL2 die Fähigkeit aufweist alle getesteten fluoreszenz-markierten DNAs zu binden. Neben den angegebenen Mengen an DNA und Protein wurden je etwa 15 U Heparin als unspezifischer Kompetitor eingesetzt. Die Ansätze wurden 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf einem 6%igen nativen PA-Gel getrennt. Die Auswertung erfolgte am Fuji FLA 5000 Imager. A) Spezifisches Bindungsmuster von TrmBL2 an den DNA-Matrizen aus den Promotorsequenzen der Gene von *pf0073*, *pf0496* und *gdh*. B) Titrationsreihe von TrmBL2 mit den *pf0073*- und *pf0496*-Promotorsequenzen. Geringe Mengen des Proteins erzeugen ein leiterartiges Bindemuster.

verschiedene multimere Proteinkomplexe bildet, welche die DNA binden und diese dadurch kondensieren. Ebenso könnte durch die Multimerisierung die Bindeaktivität von TrmBL2 zunehmen und so schrittweise mehr 'Bindestellen' besetzt werden. Zwar wurden auch bei der Chip-seq-Untersuchung der Bindestellen von TrmBL2 im Chromosom von *P. furiosus* eine große Anzahl an Loci ermittelt, jedoch erscheint die TrmBL2-DNA-Bindung *in vivo* relativ spezifisch zu sein. Wodurch die Binde-spezifität in den Zellen verursacht, oder reguliert wird, ist unklar. Deutlich wird, dass TrmBL2 *in vitro* in der Lage war alle getesteten DNA-Sequenzen zu binden.

***in vitro* Transkription.** Des Weiteren wurden verschiedene Promotorsequenzen auf eine potenzielle regulatorische Funktion von TrmBL2 bei *in vitro* Transkriptionen getestet. Als Grundlage der Untersuchungen wurden autoregulatorische Eigenschaften von TrmBL2 bezüglich der eigenen Genexpression angenommen. Dabei bindet ein Protein, welches in hohem Überschuss in der Zelle vorliegt, an die Promotorsequenz seines eigenen Gens und erschwert somit eine weitere Genexpression. Wie in Abb. 3.14 zu sehen, konnte diese These bestätigt und eine Repression der Transkription des *trmbl2*-Gens in Anwesenheit des Proteins beobachtet werden. Die Vorgehensweise bei den *in vitro* Transkriptionen entsprach den Standardvorgaben (Anhang 1.1). Diese wurden jeweils mit den in Abb. 3.14 wiedergegeben Mengen und Konzentrationen eingesetzt. Die synthetisierten radioaktiv-markierten Transkripte wurden auf einem 6%igen Harnstoff-PA-Gel getrennt und die auf eine Imaging-Plate übertragenen Signale am FujiFla 5000 Imager ausgelesen und quantifiziert. Bei Proteinkonzentration größer 300 nM (vgl. Abb. 3.14 Spur 2) wird die Synthese der *pf0496*-RNA deutlich gehemmt. Jedoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass die

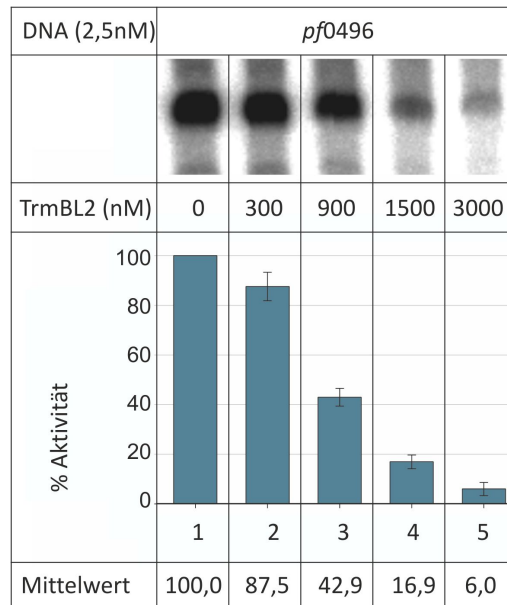


Abbildung 3.14.: Autoregulatorischer Einfluss von TrmBL2 bei *in vitro* Transkriptionsassays mit der Promotorsequenz von *pf0496* als DNA-Matrize. Die verwendete DNA-Matrize (ca. 310 bp) wurde über eine PCR mit den Primern Pf0496-156-F (5′– TTGTGGTGAAGAAAATCTTTTAAAGTT –3′) und PF0496+170-R (5′– CATCGTAAGTTCTTGGCGC –3′) aus genomischer DNA von *P. furiosus* amplifiziert. Eingesetzt wurden die jeweils angegebenen Mengen an Protein und DNA. Die Synthese der markierten RNA erfolgte 10 Minuten bei 70 °C. Angegeben ist die durchschnittliche Transkriptionsrate aus vier sich entsprechenden Versuchsreihen.

Regulation der Transkription des eigenen Gens zu den grundlegenden Funktionsbereichen von TrmBL2 gehört, da dieser Effekt nur bei einer sehr hohen Konzentrationen des Proteins auftritt. Dieser Ansatz diente als Kontrolle bei allen weiteren Ansätzen zur Untersuchung der regulatorischen Aktivität von TrmBL2 bei *in vitro* Transkriptionen an mannigfaltigen Promotorsequenzen. Wie in Abb. 3.15 zu sehen, verursachen große Mengen an eingesetztem TrmBL2 keine signifikante Veränderung der RNA-Syntheserate bei der verwendeten *gdh* DNA-Matrize. Obwohl die Menge an Transkript für die *pf0496*-Matrize, wie schon vorher beschrieben sinkt, bleibt die Menge an RNA-Produkt der simultan eingesetzten *gdh* Promotormatrize nahezu unverändert (vgl. Abb. 3.15 Spuren 2-6). Dieses Ergebnis wurde auch bei allen weiteren getesteten Promotorbereichen erzielt (Daten nicht gezeigt). Als potentielle Zielpromotoren wurden diejenigen postuliert, deren Gene bzw. Bindestellen durch die früher beschriebene Chip-seq-Analyse ermittelt wurden. Jedoch konnte für keines der neben *pf0496* getesteten Gene eine Aktivierung oder Repremierung der Transkription beobachtet werden. Somit ergab sich kein Hinweis auf eine Funktionalität von TrmBL2 als Transkriptionsfaktor.

Analytische Größenausschlusschromatographie. Um einen ersten Hinweis auf die tertiäre Struktur von TrmBL2 zu erhalten, wurde eine Größenausschluss-Chromatographie mit gereinigtem TrmBL2_{His6} an einer kalibrierten HiLoad 16/600 Superdex 200 Säule (GE Healthcare, Uppsala) durchgeführt. Hierfür wurden Standardproteine einer bekannten Größe mit dem Proteinpuffer von TrmBL2 equilibriert und auf der Säule getrennt, um das jeweilige Elutionsvolumen bzw. die

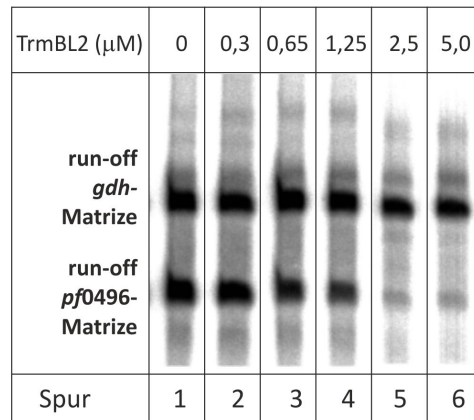


Abbildung 3.15.: Kombinierte *in vitro* Transkription mit den Promotorsequenzen des *gdh*-Gens und des *trmbl2*-Gens als DNA-Matrizen. Es wurden jeweils 2,0 nM der DNA-Matrizen eingesetzt. Die Konzentration der eingesetzten GTFs sowie der RNAP entspricht den Angaben des Standard-Protokolls (Anhang 1.1).

Retentionszeit zu ermitteln. Durch die direkte Abhängigkeit des Elutionsvolumens bzw. der Retentionszeit von der Größe des eingesetzten, globulären Proteins lässt der Vergleich mit dem Elutionsvolumens eines unbekannten Proteins Rückschlüsse über dessen Größe bzw. Aufbau zu. Dieser Gesetzmäßigkeit folgend, ließ sich bei der Größenausschluss-Chromatographie des gereinigten TrmBL2_{His6} eine große Diskrepanz zwischen der bekannten Größe des TrmBL2-Monomers von etwa 30 kDa und dem tatsächlichen Elutionsvolumen feststellen. Wie in Abb. 3.16 zu sehen, entspricht das Elutionsvolumen von TrmBL2 unter den gewählten Bedingungen dem eines Proteins der Masse 120 kDa. Wird also eine globuläre Grundstruktur von TrmBL2 vorausgesetzt würde dies darauf hinweisen, dass TrmBL2 als Homotetramer in den Zellen vorliegt. Ein solche Bildung von Proteinkomplexen, besonders von Dimeren und Tetrameren, wurde für DNA-bindende und -regulierende Proteine bereits beschrieben. Dennoch kann aus diesem Ergebnis noch keine finale Schlussfolgerung erfolgen, da ein etwaiger Einfluss der Proteinstruktur oder unbekannte Wechselwirkungen von TrmBL2 mit dem Säulenmaterial bei der Gelfiltration nicht ausgeschlossen werden können.

Zurzeit werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Welte (Universität Konstanz, Lehrstuhl für Protein-Kristallographie und molekulare Bioinformatik) Versuche unternommen die Struktur von TrmBL2 bzw. gereinigtem TrmBL2_{His6} über Röntgenkristallographie zu bestimmen.

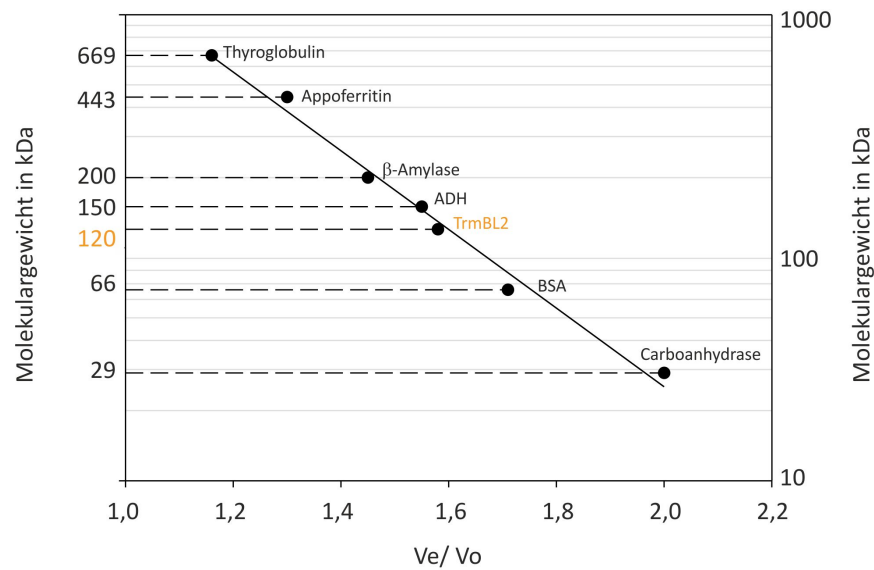


Abbildung 3.16.: Größenausschluß-Chromatographie von TrmBL2_{His6} an einer kalibrierten Superdex 200 16/60 HiLoad Säule. Das Elutionsvolumen des etwa 30 kDa großen Proteins entspricht dem eines 120 kDa großen Proteins. Demnach liegt TrmBL2 wahrscheinlich als Homotetramer vor.

3.3.4. Hitzestabilität von TrmBL2

Durch Chip-seq-Untersuchungen von *P. furiosus*-Zellen unter Hitzeschock-Bedingungen (Durchgeführt von Robert Reichelt) war die Vermutung entstanden, dass TrmBL2 an einem Mechanismus zur Adaption der Zellen an extrem hohe Temperaturen beteiligt sein könnte. Die Chip-seq-Ergebnisse der Hitzeschock-Zellen deuten eine vermehrte DNA-Bindung von TrmBL2 unter diesen Bedingungen an. Dies beinhaltet sowohl einen generellen Anstieg der detektierten Signale als auch die Zunahme an TrmBL2-Bindestellen im Genom. Im Folgenden sollte nun analysiert werden, welche Auswirkungen ein Hitzeschock auf den Zellgehalt von TrmBL2 hat und wie sich zum Vergleich der *P. furiosus* TrmBL2-Deletionsstamm bei Hitzeschockbedingungen verhält. Dadurch sollte ermittelt werden, ob sich die Vermutung bestätigen lässt und TrmBL2 an der Stabilisierung der genomischen DNA im hyperthermophilen Temperaturbereich beteiligt ist.

Wachstumsanalysen. Es wurden Wachstumsanalysen von wt *P. furiosus* und dem *P. furiosus* ΔTrmBL2-Stamm unter konstanter Kultivierungstemperatur und Hitzeschock-Bedingungen angefertigt. Für jede Versuchsreihe wurden je drei Ansätze in 20-ml-Stärke-Flüssigvollmedium analog durchgeführt und für die Erstellung der Wachstumskurve die Mittelwerte der Zellzahlen berechnet. Die Kulturen wurden je mit einer Ausgangszellichte von etwa $2,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml inokuliert und bei einer erreichten Zellzahl von etwa $1,5 - 2,0 \cdot 10^8$ die Inkubationstemperatur bei den entsprechenden Ansätzen von 95 °C auf 105 °C erhöht. Die erhaltenen Wachstumsmuster von wt *P. furiosus* (schwarze Linien) und TrmBL2-Deletionsmutante (rote Linien) bei 95 °C (○) und mit durchgeführtem Hitzeschock (●) sind in Abb. 3.17 zusammengefasst. Deutlich zu sehen ist, dass durch die Hitzeschock-Behandlung beide Zelltypen, Wildtyp und Deletionsmutante negativ in ih-

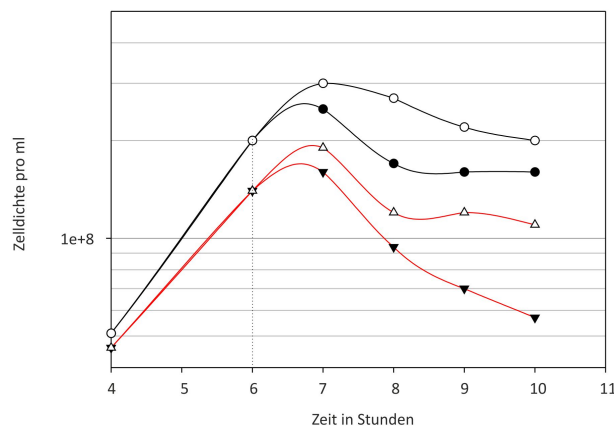


Abbildung 3.17.: Vergleich des Wachstums von *P. furiosus* Wildtyp (schwarze Linien) und TrmBL2-Deletionsmutante (rote Linien) unter Hitzeschock-Bedingungen (●) und konstanter Wachstumstemperatur (○). Gezeigt sind jeweils die aus Triplettansätzen erhaltenen Mittelwerte für den Zeitraum 4 bis 10 Stunden nach dem Beimpfen. Die Versuche wurden bei 95 °C in 20-ml-Serumflaschen durchgeführt. Die gestrichelte Linie zum Zeitpunkt 6 Stunden markiert den Beginn der Hitzeschock-Behandlung. Die Berechnung der Zelldichten in den Kulturen erfolgte mittels Thoma-Zählkammer (0,02 mm Tiefe; Marienfeld, Lauda-Königshofen) und Phasenkontrast-Mikroskopie.

rem Wachstum beeinflusst werden und sich dementsprechend bei beiden die Zellzahl vermindert. Hierbei scheint jedoch der negative Effekt für die TrmBL2-Deletionsmutante stärker zu sein als beim wt *P. furiosus*. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass bei konstanten Wachstumsbedingungen ein Unterschied in den maximal erreichten Zellzahlen der Stämme entsteht, durch den die final erreichten absoluten Zelldichten zu relativieren sind. Insgesamt kann festgehalten werden, dass es zutreffend erscheint, dass die Anwesenheit von TrmBL2 die Vitalität der Zellen bei extrem hohen Temperaturen unterstützt. Durch die Deletion von TrmBL2 wirken sich die schädlichen Effekte der Temperatur stärker auf die Zellen aus, was zu einem stärkeren Rückgang der Zelldichte führt. Dass dennoch keine unmittelbare Lyse aller TrmBL2-Deletionszellen auftritt, kann mit dem stabilisierenden Effekt von weiteren Proteinen, die bei Hitze induziert werden und welche den Zellstoffwechsel aufrecht erhalten, begründet werden.

Expressionsniveau. In einer weiteren Studie sollte der Gehalt an TrmBL2 in *P. furiosus*-Zellen, welche unter konstanter Temperatur kultiviert wurden, mit denen verglichen werden, die einer Hitzeschock-Behandlung unterzogen worden waren. Hierfür wurde Stärke-Flüssigkulturmedium (je 3x 20-ml-Serumflaschen) mit *P. furiosus* Wildtypzellen inokuliert und bei 95 °C bis zu einer Zelldichte von etwa $1,5 \times 10^8$ inkubiert. Bei einer Zellcharge wurde anschließend der Hitzeschock durchgeführt, während die restlichen Kulturen weiter bei 95 °C inkubiert wurden. Nach der Zellernte erfolgte die Präparation der Rohextrakte aus den Zellpellets sowie der Western Blot nach vorher beschriebenem Protokoll (Anhang 1.2). Bei den Western Blot Analysen wurden die Gehälter der Proteine TrmBL2, GDH und TBP in Zelllysaten aus *P. furiosus*-Zellen, welche konstant bei 95 °C gezogen worden waren, und solchen, welche mit einem Hitzeschock bei 105 °C behandelt worden waren, verglichen. Es wurden jeweils drei verschiedene Mengen an Rohextrakt für die

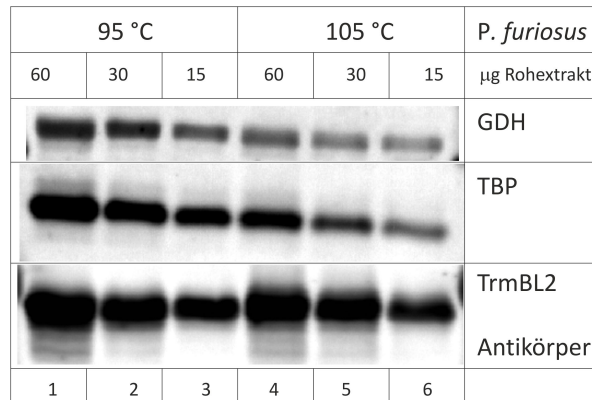


Abbildung 3.18.: **Der Gehalt von TrmBL2 in den *P. furiosus*-Zellen bleibt auch bei erhöhter Temperatur konstant.** Mit Antikörper gegen TrmBL2, TBP und GDH wurden die jeweiligen Anteile der Proteine in den Zellen detektiert. Verwendet wurden analog kultivierte und präparierte Zellysate von *P. furiosus* Wildtypzellen, gewachsen bei 95 °C mit und ohne erfolgte Hitzeschock-Behandlung bei 105 °C. Eingesetzt wurden: Spur 1 + 4: 60 µg, Spuren 2 + 5 : 30 µg und Spuren 3 + 6: 15 µg Zellysate

Untersuchung eingesetzt und die je erhaltenen Signalstärken durch den fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper am Fuji FLA 5000 Imager quantifiziert. Das Ergebnis der Studie ist in Abb. 3.18 dargestellt. Während für TrmBL2 der Gehalt des Proteins in den Zellen nahezu unverändert ist, kann für TBP und GDH eine Differenz in der vorliegenden Menge in den konstant inkubierten Zellen und denjenigen mit Hitzeschock-Behandlung um den Faktor 2 bis 4 gemessen werden. Demnach scheint durch Hitze keine vermehrte TrmBL2-Expression induziert zu werden. Hinweise für eine direkte Beteiligung von TrmBL2 an der zellulären Hitzeschock-Antwort oder einer Induktion der TrmBL2-Expression sind somit nicht gegeben. Vielmehr besitzt TrmBL2 anscheinend eine höhere Stabilität bei Hitze als dies für andere Proteine der Fall ist, wie hier für GDH und TBP gezeigt.

Hitzestabilität. Um die Relationen der vorliegenden Proteine unter den jeweiligen Bedingungen nachzuvollziehen und die weitere Thermostabilität von TrmBL2 zu testen, wurden mit Aliquots des präparierten *P. furiosus* 95 °C-Rohextrakt Hitzeversuche durchgeführt. Dafür wurden 20-µl-Proben mit je 60 µg Protein hergestellt und diese Verdünnungen des Rohextrakts jeweils für 5 Minuten in 5 °C Schritten bei 80 bis 110 °C inkubiert. 10 µl der Aliquots wurden anschließend für eine Western Blot Analyse eingesetzt (Anhang 1.2). Durch diese Hitzereihe konnte die Vermutung bestätigt werden, dass TrmBL2 im Vergleich zu vielen anderen Proteinen eine erhöhte Hitzestabilität aufweist. Im direkten Vergleich mit dem GTF TBP zeigt sich, dass das Signal des Transkriptionsfaktors ab einer Temperatur von 100 °C deutlich abnimmt, während TrmBL2 bis zu einer Temperatur von 110 °C nahezu unverändert stabil ist. Daraus folgt, dass TrmBL2 über extreme Hitzestabilität verfügt.

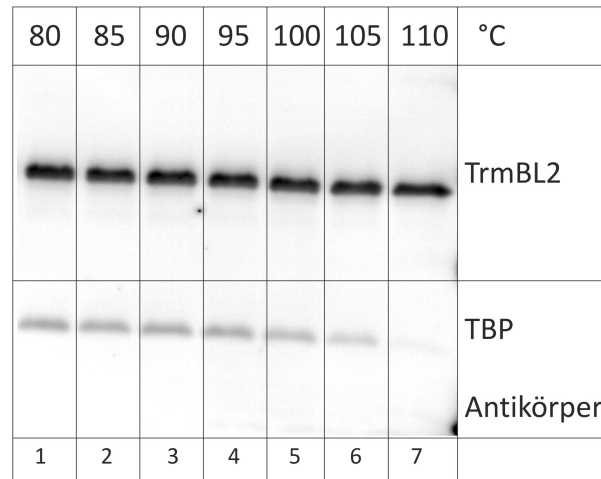


Abbildung 3.19.: **Stabilität von TrmBL2 bei Hitzeinkubation.** Identische Volumen von wt *P. furiosus*-Zellysate wurden je 5 Minuten bei den angegebenen Temperaturen inkubiert und anschließend für eine Western Blot Analyse verwendet.

3.4. Diskussion

Entsprechend der Vorgehensweise zur Charakterisierung von TrmBL1 bei *T. kodakarensis* [Kanai *et al.*, 2007] sollte auch für TrmBL2 bei *P. furiosus* vorgegangen werden, um die Funktion des Proteins zu erforschen. Es wurde eine TrmBL2-Deletionsmutante von *P. furiosus* etabliert und der Stamm für Wachstumsanalysen und Genexpressionsuntersuchungen sowie zur Detektion der chromosomalen TrmBL2-Bindestellen verwendet. Bei den Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von wt *P. furiosus* und der TrmBL2-Deletionsmutante wurden verschiedene Zucker und andere Nährstoffe als Substrate getestet, ein signifikanter Unterschied im Wachstum wurde jedoch nicht beobachtet. Das bedeutet, dass kein Zucker identifiziert werden konnte dessen Verwertung bei der Deletionsmutante zur Ausprägung eines Phänotyps, also einer Einschränkung des Wachstums geführt hätte und somit auch keine direkte Indikation des möglicherweise durch TrmBL2 regulierten Zuckermetabolismus gegeben ist (vgl. Abb. 3.11). Weiterhin konnte auch durch mRNA-Profilig von *P. furiosus* Wildtyp und der Deletionsmutante keine Gene ermittelt werden, deren Proteine zum einen am Zuckerstoffwechsel beteiligt sind und deren Expressionsniveau zum anderen in erheblichem Maße durch die An- oder Abwesenheit von TrmBL2 beeinflusst wird (vgl. Abb. 3.7). Auch der Versuch durch Chip-seq-Analysen die Bindestellen von TrmBL2 im Genom, und somit eventuell DNA-Zielsequenzen von TrmBL2 im Promotorbereich von Proteinen des Zuckerstoffwechsels zu identifizieren, erbrachte keinen Hinweis auf einen solchen Zusammenhang. TrmBL2 weist den Chip-seq-Daten zufolge zwar spezifische DNA-Bindepositionen im Chromosom von *P. furiosus* auf, aber eine Ableitung auf eine regulatorische Funktion im Bezug auf die Expression von Genen war nicht möglich. Vor allem die Tatsache, dass TrmBL2 im Genom nicht nur im Bereich der Promotorsequenzen von Genen bindet, sondern die Bindestellen häufig in intergenischen Regionen gelegen sind (vgl. Tab. 3.5), spricht dabei gegen eine alleinige Funktion von TrmBL2 als Transkriptionsregulator. Schließlich konnte auch bei *in vitro* Transkriptionsassays, außer einer autoregulatorischen Funktion von TrmBL2 am Promotor des eigenen Gens *pf0496*, kein

Einfluss auf den Transkriptionsverlauf festgestellt werden (vgl. Abb. 3.14). Diese Ergebnisse lassen eine hauptsächliche Funktion von TrmBL2 als Transkriptionsregulator mit einer Beteiligung an einer Metabolismus-abhängigen Regulation von Genen nicht plausibel erscheinen. Darauf basierend wurde die bisherige Annahme über den Funktionsbereich von TrmBL2 verworfen und in der Folge versucht die tatsächliche Funktion von TrmBL2 zu ermitteln.

Homologe. Eine neuere Studie der Funktion des Homologs von TrmBL2 in *T. kodakarensis* [Maruyama *et al.*, 2011] beschreibt das Protein als ein abundantes, Chromatin-formendes DNA-Bindeprotein. Auch hier wurde festgestellt, dass TrmBL2 sowohl Bindestellen in intergenischen als auch in den kodierenden Bereichen des Chromosoms besitzt. Diese Art der Verteilung ähnelt neben Transkriptionsfaktoren und -Regulatoren auch bakteriellen Nukleoid-assoziierten Proteinen wie etwa IHF (integration host factor) und H-NS (Histone-Like Nucleoid Structuring Protein) [Grainger *et al.*, 2008]. Dabei bestimmt TrmBL2 zusätzlich durch die Ausbildung von fädigen Strukturen das Erscheinungsbild der gesamten DNA [Maruyama *et al.*, 2011]. Diese entstehen möglicherweise durch die Bindung von TrmBL2 an dsDNA, welche die fortgesetzte Bindung von TrmBL2-Molekülen entlang des DNA-Strangs über Protein-Protein-Wechselwirkungen begünstigt. Auch dieses Verhalten der Komplexbildung wurde vorher für H-NS beschrieben [Bouffartigues *et al.*, 2007].

Die Genexpressionsanalysen mit dem wt *T. kodakarensis* und einem TrmBL2-defizienten Stamm offenbarten eine Deregulation von mehr als 8 % der annotierten Gene als Folge der Deletion. Die fortgesetzte Analyse der Bindestellen von TrmBL2 legt dabei einen Zusammenhang mit der Lokalisation der Bindesteque im Promotorbereich eines Gens und der reprimierenden Funktion von TrmBL2 bezüglich der Expression nahe. Jedoch waren wie auch bei *P. furiosus* ein großer Anteil der relevanten, kodierenden Regionen als 'hypothetische Proteine' annotiert, was eine Schlussfolgerung bezüglich der physiologischen Rolle nicht ermöglicht. Den auffälligen Zusammenhang von Besetzung der Promotorregion durch TrmBL2 und der Verminderung des Transkriptlevels des stromabwärts gelegenen Gens hatte Maruyama als die Reprimierung der Transkription durch Verhinderung der Zugänglichkeit für die RNAP interpretiert. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Transkriptionen mit DNA-Matrizen der entsprechenden Gene konnte jedoch kein Hinweis für eine solche Aktivität beobachtet werden. Durch EMSA-Experimente konnte *in vitro* die Sequenz-unspezifische Bindefähigkeit von TrmBL2 an dsDNA [Lipscomb *et al.*, 2009] nachvollzogen werden (vgl. Abb. 3.13). Jedoch wurde bei keiner der Matrizen -außer pf0496- das Level an gebildetem Transkript durch die Zugabe von TrmBL2 beeinflusst (vgl. Abb. 3.15).

Aufgrund der Häufigkeit und Verteilung über das Chromosom kann darüber spekuliert werden, ob es sich bei den TrmBL2-Proteinen der *Thermococcales* um eine weitere Art von chromosomalen Proteinen handelt. Da trotz intensiver Bemühungen weder bei *T. kodakarensis* [Maruyama *et al.*, 2011] noch *P. furiosus* eine Konsensuserkennungssequenz der TrmBL2-Bindung identifiziert werden konnte, bleibt die Ursache für die spezifische Lokalisation von TrmBL2 am Chromosom unbekannt. Lediglich eine Tendenz der bevorzugten Bindung von TrmBL2 an AT-reiche DNA-Sequenzbereiche konnte ermittelt werden. Für archaeelle Histone ist im Gegensatz dazu eine Präferenz bezüglich der DNA-Bindemotive (Nukleosom Positionierungs Signale) bekannt

[Nalabothula *et al.*, 2013]. Deshalb kann darüber spekuliert werden, ob TrmBL2 grundsätzlich an Nukleosomen-freie und Transkriptions-inaktive DNA-Regionen bindet [Maruyama *et al.*, 2011], und die vorliegende DNA-Sequenz nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Es kann anhand der generierten Daten nicht ausgeschlossen werden, dass das Aktivitätsspektrum von TrmBL2 unter den gewählten Kultivierungsbedingungen nicht relevant und daher unauffällig war. So wurde etwa bei einem Methanogenen, *M. acetivorans*, ein globales Regulatorprotein, MreA, beschrieben, welches homolog zu TrmBL2 ist [Reichlen *et al.*, 2012]. Für MreA wurde eine zentrale Rolle bei der Regulation der acetotrophischen- und methylotrophischen Metabolismuswege festgestellt. Dabei scheint MreA eine duale Funktion bei der Transkriptionsregulation einzunehmen, indem es Gene des Acetat-Metabolismus aktiviert und Gene, die spezifisch für den methylotrophischen Metabolismus sind, reprimiert. Analog zu TrmBL2 konnte auch bei MreA keine Konsensussequenz eines DNA-Bindemotivs bestimmt werden.

Des Weiteren ist auch über die mögliche Struktur und Zusammensetzung des Chromatins bzw. Nucleoids bei *P. furiosus* momentan nur wenig bekannt. Der Vergleich mit *Sulfolobus* zeigt, dass extensive Veränderungen in der Organisation des Chromatins in den verschiedenen Wachstumsphasen der Zellen oft mit Zellzyklus-abhängigen Expressionsmustern der Chromatin-Proteine einhergehen [Driessen und Dame, 2011]. Jedoch trifft dies nicht für alle relevanten Proteine gleichermaßen zu und einige Proteine werden auch mit stabilem Niveau exprimiert. Auch für TrmBL2 wurden unterschiedliche Expressionsniveaus in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der *T. kodakarensis*-Zellen beschrieben [Maruyama *et al.*, 2011]. In welcher Form TrmBL2 im Zusammenspiel mit anderen Chromatin-Proteinen und -Histonen an der dynamischen Strukturierung des Genoms beteiligt ist, bleibt zu klären.

Hitzeschock-Behandlung. Weiterhin wurde der Einfluss einer erhöhten Temperatur auf den Organismus *P. furiosus* und TrmBL2 studiert. Bei den Chip-seq Untersuchungen deuteten die Daten auf eine scheinbar verstärkte Bindeaktivität von TrmBL2 in wt *P. furiosus* hin. Daher wurde ein Vergleich der Vitalität des Wildtyps und der TrmBL2-Deletionsmutante unter genannten Bedingungen durchgeführt (vgl. Abb. 3.17). Bei diesem zeigte sich ein deutlicher Wachstumsvorteil des Wildtyps gegenüber der TrmBL2-Deletionsmutante bei erhöhter Inkubationstemperatur. Obwohl bereits bei einer Kultivierungstemperatur von 95 °C ein Unterschied des Wachstumsverhaltens beobachtet werden kann, verstärkt sich der Effekt durch die Erhöhung der Temperatur auf 105 °C eindeutig. Dennoch tritt im Fall der TrmBL2-Deletionsmutante zwar eine größere Reduktion der Zellzahl auf, eine unmittelbare Zellyse bzw. das Absterben aller Zellen wurde jedoch nicht beobachtet. Dies deutet auf die kompensatorische Wirkung weiterer DNA-bindender und -stabilisierender Proteine hin. Auch Maruyama hatte beim TrmBL2-Deletionsstamm von *T. kodakarensis* dennoch die Kondensation des Chromosoms beobachten können und daraus abgeleitet, dass TrmBL2 für diese nicht essentiell ist und demzufolge zusätzlich noch andere Proteine diese Aufgabe erfüllen [Maruyama *et al.*, 2011]. Durch die Analysen des Gehalts an TrmBL2 in Zellen ohne und mit Hitzeschock-Behandlung in Relation zu anderen zellulären Bestandteilen (vgl. Abb. 3.18) wurde ein erstes Indiz für die beim Chip-seq verstärkt erscheinende Bindeaktivität von TrmBL2 erlangt. Im Vergleich zu anderen zellulären Proteinen besitzt TrmBL2 demnach eine größere Ther-

mostabilität und liegt somit nach einem Hitzeschock um den Faktor zwei- bis viermal mal so häufig vor wie bei optimalen Temperaturbedingungen. Auch anhand von Hitzetests mit *P. furiosus*-Rohextrakt konnte dieses Charakteristikum von TrmBL2 nachvollzogen werden. Während offensichtlich viele andere Zellbestandteile bei Temperaturen über 100 °C nach nur geringer Inkubationszeit deutlich degradiert werden, bleibt TrmBL2 selbst bei 110 °C stabil erhalten. Dadurch erhöht sich der absolute Anteil von TrmBL2 im zellulären Kontext, was eine scheinbare Verstärkung der DNA-Bindung erklären kann. Gleichfalls besteht auch die Möglichkeit, dass durch den hitzebedingten Rückgang des zellulären Proteins, darunter auch der Bestandteile des Transkriptionsapparates, weite Teile der DNA frei vorliegen und diese tatsächlich vermehrt von TrmBL2 gebunden und kondensiert werden. Durch weiterreichende Versuche muss geklärt werden, welchen Anteil beide Aspekte an dem beobachteten Phänomen der Chip-seq-Analyse haben.

Fazit und Hypothese. Da TrmBL2 vor allem innerhalb der *Thermococcales* weit verbreitet ist, kann darüber spekuliert werden, dass das Protein Teil eines Mechanismus ist, mit dem diese Organismen ihre DNA vor dem schädlichen Einfluss der Hitze schützen und somit eine Adaption an eine hyperthermophile Lebensweise darstellt. Nach den derzeitigen Erkenntnissen kann gemutmaßt werden, dass TrmBL2 generell alle freie und nicht transkriptionsaktive dsDNA, insbesondere die relativ Hitze-sensitiven AT-reichen Regionen bindet und gegen Hitzeschädigung schützt. Die Menge an TrmBL2-Protein in der Zelle könnte mit dem Kontingent an freier und 'stiller' DNA korrelieren. Bei relativ sequenzunspezifischer DNA-Bindung steigt mit einem erhöhten TrmBL2-Gehalt der Zelle auch die Wahrscheinlichkeit, dass der *pf0496*-Promotor selbst gebunden und dadurch die Autoregulation wirksam wird. Da der Anteil an Transkriptions-aktiver und -stiller DNA je nach dem Metabolismus der Zelle variiert, könnte damit der unterschiedliche TrmBL2-Gehalt bei Zellen, die auf Pyruvat und Stärke kultiviert wurden, erklärt werden (vgl. Abb. 3.10). Der Metabolismus von Pyruvat ist enzymatisch viel aufwändiger. Damit muss im Vergleich zum Stärkemetabolismus eine größere Anzahl an Proteinen aus dem Genom transkribiert werden. Somit ist ein größerer Anteil der chromosomalen DNA vom Transkriptionsapparat besetzt und weniger DNA liegt frei vor.

4. Gerichtete Evolution einer chimären Rpb5/RpoH-Untereinheit

4.1. Einleitung

4.1.1. RpoH und Rpb5

Die Untereinheit Rpb5 aus *S. cerevisiae* hat eine Größe von 25 kDa und ist die größte gemeinsame Untereinheit der drei eukaryotischen RNAPs I, II und III. Das Protein unterteilt sich in eine C-terminale Domäne (ca. 9 kDa; AS 143-215), welche in allen drei eukaryotischen RNAPs hoch konserviert ist [Buhler *et al.*, 1974, Woychik *et al.*, 1990], und eine spezifische N-terminale Domäne (ca. 18 kDa; AS 1-142) [Todone *et al.*, 2000]. Die archaeelle RNAP-Untereinheit RpoH hat bei *P. furiosus* eine Größe von 9,2 kDa und ist homolog zur C-terminalen Domäne der eukaryotischen Untereinheit Rpb5 [Langer *et al.*, 1995]. Die N-terminale Assembly-Domäne des eukaryotischen Gegenstücks fehlt hingegen in der archaeellen Untereinheit RpoH [Kusser *et al.*, 2008], wodurch die signifikante Größendifferenz der homologen Untereinheiten bedingt wird [Thiru *et al.*, 1999, Todone *et al.*, 2000]. Für die hoch konservierte C-terminale Domäne können neben der hohen Sequenzidentität auch viele Übereinstimmungen bezüglich der Position und Struktur der Untereinheit im Enzymkomplex bei allen RNAP-Typen angenommen werden.

Im Genom vieler bisher sequenzierter Archaeen bildet das Gen, das für die RpoH-Untereinheit der RNAP kodiert, das erste Gen eines Operons mit den Genen der katalytischen Untereinheiten RpoB, RpoA' und RpoA". Bei Interaktionsstudien mit Untereinheiten der *Pyrococcus*-RNAP konnte zudem eine hohe Affinität zwischen RpoH und RpoA" [Goede *et al.*, 2006] nachgewiesen werden. Dies lässt eine wichtige Funktion der Untereinheit RpoH bei der Assemblierung und Stabilisierung der großen katalytischen Untereinheiten RpoA', RpoA" und RpoB vermuten. Unterstützt wird diese Annahme durch Kristallstrukturdaten der RNAP aus *Sulfolobus* [Hirata *et al.*, 2008b] und der RpoH-Untereinheit von *M. jannaschii* [Thiru *et al.*, 1999], wonach RpoH an der Schnittstelle von RpoA' und RpoA" liegt [Hirata *et al.*, 2008b]. Die Abwesenheit der N-terminalen Domäne von RpoH legt in der archaeellen RNAP eine positiv geladene Furche zwischen RpoH und den Helices 3 und 4 von RpoA' frei [Korkhin *et al.*, 2009]. RpoH ist aus einem verdrehten, viersträngigem gemischten β -Faltblatt (C1-C4) aufgebaut, welches auf einer Seite von zwei kurzen α -Helices ($\alpha 8$ und $\alpha 9$) flankiert wird (vgl. Abb. 4.1). Ein β -Ribbon-Motiv besitzt dabei eine hydrophobe, basische Oberfläche, die wahrscheinlich entscheidend für Interaktionen mit anderen RNAP-Untereinheiten und eventuell mit Nukleinsäuren ist. Untersuchungen an Initiations- und Elongationskomplexen weisen darüber hinaus auf eine Umlagerung von RpoH beim Übergang in die Elongationsphase hin [Grünberg *et al.*, 2010]. Während RpoH im Präinitiationskomplex an

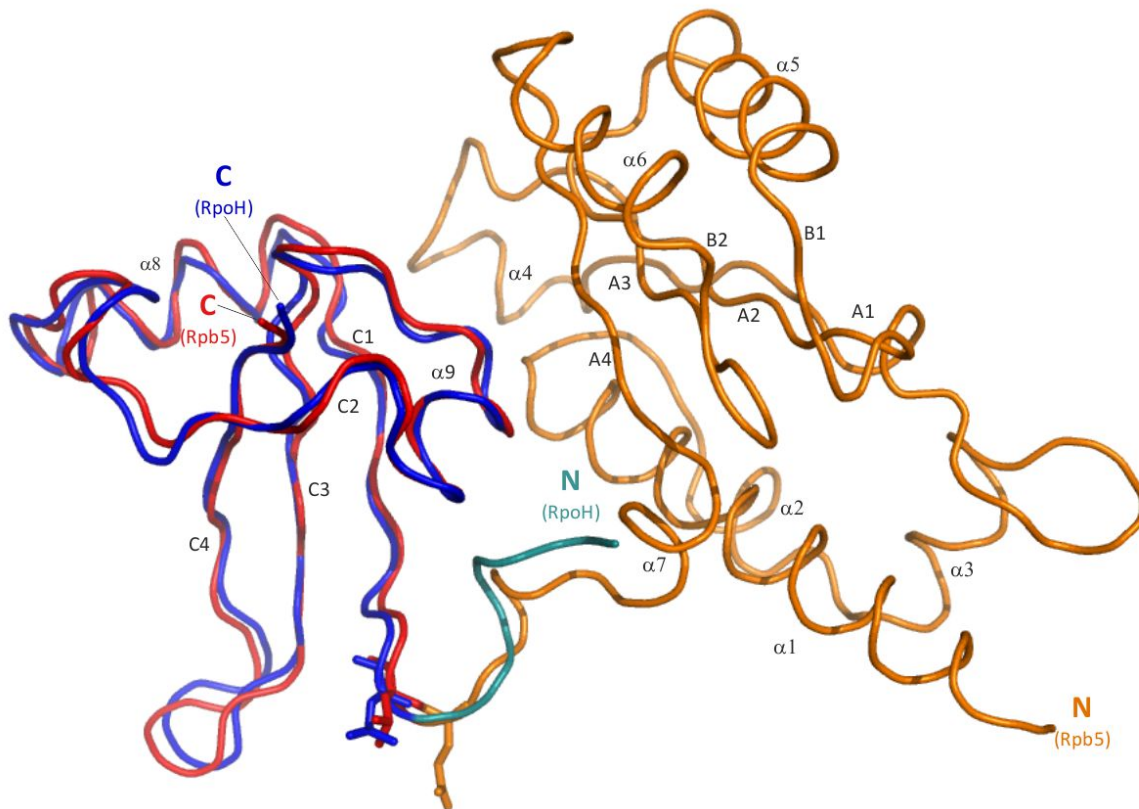


Abbildung 4.1.: Superpositionierung von RpoH aus *S. solfataricus* und Rpb5 aus *S. cerevisiae*. Der N-terminale Teil von Rpb5 ist in orange, der C-terminale Teil in rot dargestellt. Das archaeelle RpoH-Modell ist in blau wiedergegeben. Die nicht konservierten Aminosäuren am N-Terminus (AS 1-14) von RpoH, die nicht mit Rpb5 übereinstimmen, sind in hellblau abgebildet. Die Abbildung wurde mittels der Dalilite Software (www.ebi.ac.uk/Tools/structure/dalilite) und anhand der Strukturdaten von *M. jannaschii* [Thiru *et al.*, 1999] und *S. solfataricus* [Hirata *et al.*, 2008b] erstellt, bzw. wurden von Tobias Seitz und Bettina Sommer zur Verfügung gestellt. Sekundärstrukturelemente: α -Helices α 1- α 9, gemischte viersträngige β -Faltblätter A1-A4 und C1-C4, zweisträngiges β -Faltblatt B1+B2.

Position +12 bis +20 des Promotors des *gdh*-Gens detektiert werden kann [Bartlett *et al.*, 2004, Hirata *et al.*, 2008b], erscheint es in der Elongationsphase in die Nähe des aktiven Zentrums und der DNA-Matrize versetzt.

Auch bei der eukaryotischen Pol-II zeigen Strukturdaten, dass Rpb5 in engem Kontakt mit der Rpb1-Untereinheit des Core-Enzyms steht [Cramer *et al.*, 2001]. Kontakte im Enzym werden hauptsächlich über die C-terminale Domäne mit Rpb1 ausgebildet, diese sind vergleichbar mit den Interaktionen von RpoH mit RpoA" [Todone *et al.*, 2000]. Die große N-terminale Domäne besteht aus einem viersträngigem gemischtem β -Faltblatt (A1-A4), das umgeben ist von sieben α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 7$). Ein zusätzliches, zweisträngiges β -Faltblatt (B1-B2) liegt senkrecht zu dem zentralen Strang des beschriebenen viersträngigen β -Faltblattes (vgl. Abb. 4.1). Die C-terminale Domäne von Rpb5 entspricht in ihrer Struktur RpoH [Todone *et al.*, 2000]. Der N-terminale Teil bildet die so genannte Jaw-Domäne, die das Ende des DNA-Kanals im Pol-II-Kristall markiert [Cramer *et al.*, 2001], und ist wahrscheinlich für den Kontakt von Rpb5 mit der DNA stromabwärts der Transkriptionsblase verantwortlich [Kim *et al.*, 1997]. Die Untereinheit Rpb5 kann aufgrund ihrer exponierten Lage verschiedenste Kontakte mit einer Vielzahl von spezifischen Partnern und Regulatoren der Transkription ausbilden. Es konnte eine Interaktion von Rpb5 mit dem Faktor Rpa30 des TFIIF-Komplexes [Wei *et al.*, 2001], welcher eine strukturelle Homologie zum bakteriellen sigma-Faktor aufweist, und vor allem bei der Initiation der Transkription von Nutzen ist, nachgewiesen werden. Ebenso konnten Kontakte mit Rpa190, dem Homolog der Untereinheit Rpb1 in der Pol-I [Miyao und Woychik, 1998], mit dem Hepatitis-B-Virus X-Protein [Le *et al.*, 2005], TFIIB [Lin *et al.*, 1997] und TFIIE [Hayashi *et al.*, 2005] gezeigt werden. Rpb5 besitzt damit eine wichtige Aufgabe in der Kommunikation zwischen dem RNAP-Kern und einer Reihe von basalen, genspezifischen Transkriptionsfaktoren.

Durch detaillierte Mutationsanalysen und Transkriptionsstudien wurde ermittelt, dass die große N-terminale Helix sowie ein kurzes Motiv vor dem Übergang zur C-terminalen Domäne des Proteins für die Funktion von Rpb5 in Hefe essentiell sind [Zaros *et al.*, 2007]. Die Kontakte der konservierten C-terminalen Domäne von Rpb5 zu Rpb1 könnten zur korrekten Positionierung der Bridge Helix und des Switch 1 Loop im aktiven Zentrum beitragen. Wie bereits früher beschrieben, sorgen Bridge Helix und Switch 1 Loop für die korrekte Positionierung der DNA im aktiven Zentrum und stromabwärts der Transkriptionsblase. Während die Aminosäuresequenz der Bridge Helix in RNAPs aus den drei Domänen des Lebens hoch konserviert vorliegt [Cramer *et al.*, 2001, Hirata *et al.*, 2008b, Vassylyev *et al.*, 2007], ist die Struktur des Switch 1 Loops nur in den eukaryotischen und archaeellen RNAPs konserviert [Gnatt *et al.*, 2001]. Demzufolge besitzt die Untereinheit Rpb5 der RNAP zwei Funktionen. Die für Eukaryoten spezifische N-terminale Domäne ist durch Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren an der komplexen Genregulation höherer Organismen beteiligt. Hingegen scheint der konservierte C-terminale Teil eine strukturelle Aufgabe in der Positionierung und Stabilisierung der katalytischen Einheiten im offenen Komplex zu haben. Aufgrund der großen Ähnlichkeit von C-terminaler Domäne und RpoH könnte man eine vergleichbare Funktion für RpoH in der archaeellen Polymerase vermuten.

Bei Archaeen ist es möglich aktive RNAP aus den einzelnen Untereinheiten zu rekonstituieren [Werner und Weinzierl, 2002, Naji *et al.*, 2007], was eine detaillierte Funktionsanalyse der einzel-

nen Untereinheiten erlaubt. Untersuchungen mit RNAP, die ohne RpoH rekonstituiert wurden (Δ RpoH RNAP), zeigten eine drastische Reduzierung der Aktivität in unspezifischen Transkriptionstests auf 10 % der wt Aktivität [Werner und Weinzierl, 2002]. Der Δ RpoH RNAP-Komplex zeigte schwerwiegende Defekte in der Bildung des Präinitiationskomplexes, die Bildung eines offenen Komplexes konnte nicht nachgewiesen werden [Reich, 2010]. Positive Regulatoren wie Ptr2 [Ouhammouch und Geiduschek, 2005] und TFE können die Transkriptionsaktivität des Δ RpoH-Enzyms in einem Umfang stimulieren, durch den zum wt Enzym vergleichbare Werte erreicht werden [Ouhammouch, 2004]. Versuche mit rekonstituierter Δ RpoH RNAP, bei denen Rpb5 zugegeben wurde, demonstrierten, dass die eukaryotische Untereinheit in der Lage ist, das archaeelle Homolog zumindest bei *in vitro* Transkriptionsassays fast vollständig zu ersetzen [Grünberg *et al.*, 2010]. Transkriptionsversuche mit der Δ RpoH RNAP und einer chimären Rp5H-Untereinheit zeigten hingegen eine verminderte Aktivität im Vergleich zur wt RNAP, die aber dennoch über dem Niveau der Δ RpoH-RNAP lag.

Mit Hilfe von Komplementierungsversuchen in *S. cerevisiae* war bereits früher ermittelt worden, dass Rpb5 die einzige gemeinsame Untereinheit der drei RNAPs ist, die nicht durch das humane Gegenstück ersetzt werden kann [Miyao und Woychik, 1998]. Anfangs war nur der Austausch durch chimäre Untereinheiten möglich, bei denen nahezu die gesamte N-terminale Domäne der Hefe erhalten bleibt, da anscheinend nur die C-terminale Region des humanen Rpb5 den entsprechenden Bereich der Hefeuntereinheit komplementieren konnte. Detaillierte Mutationsanalysen zeigten, dass nur ein kleiner, zentral gelegener Abschnitt (Positionen 121-146 in *S. cerevisiae*) in der N-terminalen Domäne der Rpb5-Untereinheit nicht mit der entsprechenden humanen Sequenz ersetzt werden kann [Zaros *et al.*, 2007]. Auch Versuche bei einem Rpb5-defizienten Hefestamm, dessen Funktion *in vivo* durch das archaeelle RpoH oder einer chimären Rp5H-Untereinheit, einem Fusionsprotein aus der N-terminalen Erweiterung von Rpb5 und dem C-Terminus aus RpoH von *P. furiosus*, zu ersetzen, waren nicht erfolgreich [Thomm *et al.*, 2009]. Obwohl die Funktion der Pol-II in Hefe weder durch RpoH noch Rp5H wieder hergestellt werden konnte, wurde für die chimäre Untereinheit Rp5H, im Gegensatz zum archaeellen RpoH, der Einbau in die Pol-II nachgewiesen [Reich, 2010]. Die Transkriptionsrate der Pol-II mit Rp5H-Fusionsprotein lag bei *in vitro* Ansätzen auf wt Niveau. Die Pol-II scheint also kein Defizit in der Transkriptionskompetenz aufzuweisen, dennoch ist die veränderte Polymerase *in vivo* in Hefe letal, was auf eine ungenügende Stabilisierungs- und Assemblierungsfähigkeit der Rp5H-Untereinheit bei Pol-I, -II und -III hinweisen könnte.

Aufgrund der signifikanten Sequenzhomologie von RpoH und der N-terminalen Domäne von Rpb5 wurde von Bettina Sommer (am Lehrstuhl für Biochemie II der Universität Regensburg, unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhard Sterner) detaillierter analysiert, ob die konservierte Struktur den funktionellen Austausch der C-terminalen Domäne von Rpb5 mit der archaeellen Untereinheit erlaubt [Sommer, 2009]. Für Komplementierungsversuche in Hefe wurde der Stamm YFN2 verwendet, welcher eine Deletion von *rpb5* im Chromosom aufweist [Navarro und Thuriaux, 2000]. Um die Vitalität des Stammes zu gewährleisten, trägt er zusätzlich das Plasmid pFL44-RPB5, welches die kodierenden Sequenzen für die Rpb5-Untereinheit und einen URA3-Marker zur Selektion mit FOA beinhaltet. Es wurden die Shuttle-Vektoren pRS424-rpb5 und pRS423-

rp5H generiert. pRS424-rpb5 enthält als Positivkontrolle die kodierende Sequenz von *rpb5*, deren Expression unter Kontrolle des konstitutiven RPS28B-Promotors steht und an welche ein N-terminaler Flag-Tag fusioniert wurde [Ferreira-Cerca *et al.*, 2007]. Bei pRS423-rp5H wurde die konservierte C-terminale Domäne von Rpb5 durch den homologen Bereich von RpoH ersetzt. Die anschließenden Komplementationsansätze zeigten, dass nur das Kontrollplasmid mit der wt Untereinheit die Funktion von Rpb5 in dem Hefedeletionsstamm übernehmen konnte. Das chimäre Rp5H-Fusionsprotein hingegen konnte dem Stamm YFN2 keine Vitalität vermitteln, was auch die Ergebnisse der vorher durchgeführten Analysen bestätigt [Thomm *et al.*, 2009]. Durch gerichtete Evolution sollten chimäre Rp5H-Varianten identifiziert werden, welche die Funktion der Pol-II *in vivo* in einem Rpb5-Hefedeletionsstamm substituieren können [Sommer, 2009]. Mit Hilfe von error-prone PCR-Ansätzen und MnCl₂-Beigabe wurde aus pRS423-rp5H eine Klonbibliothek erstellt. Dabei waren aufgrund der Primer-Hybridisierung die ersten elf und die letzten neun Aminosäuren des Rp5H-Fusionsproteins von der Mutagenese ausgeschlossen. Die erzeugte Klonbibliothek wurde für Komplementationsexperimente mit dem Hefe-*rpb5*-Deletions-Stamm YFN2 unter FOA-Selektion verwendet und die erfolgreiche Komplementation durch wiederholte Transformation von YFN2 bestätigt. Sequenzanalysen der Plasmid-DNAs der transformierten Stämme brachten die Erkenntnis, dass der letale Phänotyp des *rpb5*-Hefedeletionsstammes durch die Expression einer nur geringfügig veränderten chimären Rp5H-Untereinheit überwunden werden kann. Tatsächlich erscheint eine einzige Basensubstitution, welche den Aminosäureaustausch E197K verursacht, ausreichend, um eine erfolgreiche Komplementation in Hefe mit dem chimären Rp5H zu ermöglichen. Neben dem essentiellen E197K Aminosäureaustausch in der archaeellen C-terminalen Domäne wurden drei weitere, optionale Modifikationen in der N-terminalen Domäne von Rp5H, V23I, S68T und M75K beobachtet. Der durch die Mutagenese erzeugte Austausch von Glutamat (E) gegen Lysin (K) führt zu einer Annäherung der Sequenz der archaeellen Domäne an das homologe eukaryotische Protein Rpb5, das an der entsprechenden Stelle ebenfalls einen Lysinrest trägt [Sommer, 2009]. Vergleichende Wachstumsanalysen der erzeugten Stämme mit den Varianten des Rp5H-Fusionsproteins mit dem Rpb5-Kontrollstamm zeigten ein deutliches Wachstumsdefizit der E197K-Mutante gegenüber der Kontrolle und den Varianten mit zusätzlichen Modifikationen in der eukaryotischen N-terminalen Domäne. Demnach scheinen die zusätzlichen Mutationen (V23I, S68T und M75K) das Wachstum der E197K-Mutante zu stimulieren, wobei die M75K-Mutation scheinbar den stärksten Einfluss hat. Insgesamt zeigten alle erzeugten Stämme der Rp5H-Varianten eine gewisse Temperatursensitivität und waren im Vergleich zum Rpb5-Kontrollstamm bei erhöhter Temperatur deutlich in ihrer Wachstumsrate vermindert. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die singuläre Punktmutation E197K in der C-terminalen Domäne des Rp5H-Fusionsproteins ausreichend ist, um die Komplementation im Hefe-*rpb5*-Deletionsstamm zu ermöglichen, wohingegen das chimäre Fusionsprotein aus N-terminaler eukaryotischer und C-terminaler Domäne aus *P. furiosus* ohne zusätzliche Mutation dazu nicht in der Lage ist.

4.1.2. Zielsetzung

Ziel war die Verifizierung inwiefern die Punktmutation des chimären Fusionsproteins Auswirkungen auf das Wachstum von *P. furiosus* hat. Varianten von RpoH [Pöllmann, 2010] und der chimären Untereinheit Rp5H [Knörschild, 2011] sollten homolog ins Genom von *P. furiosus* integriert werden, um den Einfluss der Substitution dieser Aminosäure sowohl im Rp5H-Fusionsprotein als auch in der archaeellen RpoH-Untereinheit auf *P. furiosus in vivo* zu analysieren.

4.2. Materialien und Methoden

Alle weiteren verwendeten Materialien und Methoden sind im Kapitel ‘Standard-Methoden und Materialien’ (Anhang 1.1) gelistet. Die erzeugten Plasmide und Mutanten wurden in die Klonbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Regensburg aufgenommen. Die durch DNA-Sequenzierung verifizierten Nukleotidabfolgen der erzeugten Plasmide und Mutanten wurden digital am Lehrstuhl für Mikrobiologie hinterlegt.

4.2.1. Bakterien- und Archaeenstämme

Stamm	Klonnummer	Merkmal/Hersteller
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MURPf38	RpoH _{His/Strep}
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MURPf39	RpoH _{His/Strep} E62K

Verwendete Plasmide

Plasmid	Klonnummer	Merkmal/Hersteller
pUC19-RpoH _{His/Strep}	pMUR27	Substitution von <i>pf1565</i> durch eine Genversion mit Protein-Tags (David Pöllmann)
pUC19-RpoH _{His/Strep} E62K	pMUR28	Substitution von <i>pf1565</i> durch eine Genversion mit E62K-Modifikation und Protein-Tags (Martina Knörschild)
pUC19-Rp5H _{His/Strep}	pMUR43	Substitution von <i>pf1565</i> durch ein chimäres Rpb5H-Fusionskonstrukt (Martina Knörschild)
pUC19-Rp5H _{His/Strep} E62K	pMUR54	Substitution von <i>pf1565</i> durch ein chimäres Rp5H-Fusionskonstrukt mit E62K-Modifikation (Martina Knörschild)
pUC19 TKSImR	pMUR62	Simvastatin-Resistenzkassette aus <i>T. kodakarensis</i>
pRS423-rp5H'(E197K)	—	chimäres Rp5H-Fusionskonstrukts mit E62K-Modifikation zur Komplementation in Hefe (Bettina Sommer)

4.2.2. DNA-Manipulationen und Plasmid-Konstruktionen

pMUR27 und pMUR28 Mit dem Plasmid pMUR27 wurde zunächst ein Konstrukt erstellt, durch welches die Sequenz der wt RpoH-Untereinheit, *pf1565*, der RNAP chromosomal durch eine Variante mit N-terminalen Streptavidin- und Hexahistidin-Proteintags ersetzt wurde. Durch einfache Überhang-PCRs (Anhang 1.1) wurden zwei DNA-Fragmente erstellt [Knörnschild, 2011]. Das erste Fragment bestand aus der 1000 bp langen stromaufwärts Region von *rpoH* exklusiv der etwa 100 bp langen Promotorregion des Gens (amplifiziert aus genomischer *P. furiosus* DNA mit den Primern Nr. 1+2) und der früher beschriebenen Simvastatin-Resistenzkassette. Diese beinhaltet die Sequenzen der *hmgcr* aus *T. kodakarensis* unter Kontrolle von Promotor- und Terminatorsequenz des *gdh*-Gens (*tk1431*) (amplifiziert aus pMUR62 mit den Primern Nr. 3+4). Des Weiteren wurde ein Fragment generiert, bei dem die Sequenzen zur Kodierung eines N-terminalen Streptavidin- und Hexahistidin-Proteintags zwischen die etwa 100 bp lange Promotorregion von *pf1565*, inklusive dem Translationsstartcodon (Primer Nr. 5+6) und dem *rpoH*-Genbereich mit anschließender etwa 1000 bp langer stromabwärts liegender chromosomaler Sequenz (Primer Nr. 7a+8 und 7b+8) eingebunden wurde. Beide Fragmente wurden nach Behandlung mit PNK in *Sma*I-linearisierten pUC19-Vektor ligiert und subkloniert (Anhang 1.1 und 1.1) [Pöllmann, 2010]. Aus den erzeugten Plasmiden wurden beide Fragmente über PCRs amplifiziert (Primerkombinationen 1+4 und 5+8), erneut durch einfache Überhang-PCRs fusioniert (Primerkombination 1+8) und das Gesamtkonstrukt nach *EcoRV*-Restriktionshydrolyse in *Sma*I-linearisierten pUC19-Vektor integriert. Der fertig gestellte Vektor wurde in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert und positive Klone mit Kolonie-PCR (Anhang 1.1) ermittelt. Eine positiv getestete Kolonie wurde zur Plasmidisolierung (Anhang 1.1) genutzt und anschließend die Richtigkeit des erzeugten Vektors pMUR27 über Sequenzierungen verifiziert (Daten nicht gezeigt; [Pöllmann, 2010]).

Der konstruierte Vektor pMUR27 wurde im Anschluss verwendet, um über ortsspezifische Mutagenese (Stratagene Quick Change Site-Directed Mutagenese Kit; Aqilent Technologies, Santa Clara, USA) die Substitution des Glutamats an Position 62 der exprimierten RpoH-Untereinheit durch Lysin zu bewirken [Knörnschild, 2011]. Die hierfür eingesetzten Primer (Nr. 9+10) waren durch Phosphatreste an den 5'-Enden modifiziert. Das PCR-Produkt wurde zur Entfernung des Ausgangsplasmids mit *Dpn*I hydrolysiert, das amplifizierte Plasmid über blunt-ends ligiert und in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Die Plasmide wurden anschließend über Sequenzierungen verifiziert (Daten nicht gezeigt). Wie beschrieben (Anhang 1.3), wurden die Plasmide pMUR27 und pMUR28 (vgl. Abb. 4.2) in linearisierter Form durch Hitzeschock in *P. furiosus* transformiert und mit 10 μ M Simvastatin selektioniert. Aus einer daraus angefertigten Reinkultur von MURPf38 und MURPf39 wurde genomische DNA isoliert und über PCRs und DNA-Sequenzierungen die Sequenzabfolge des veränderten Chromosomenabschnitts analysiert.

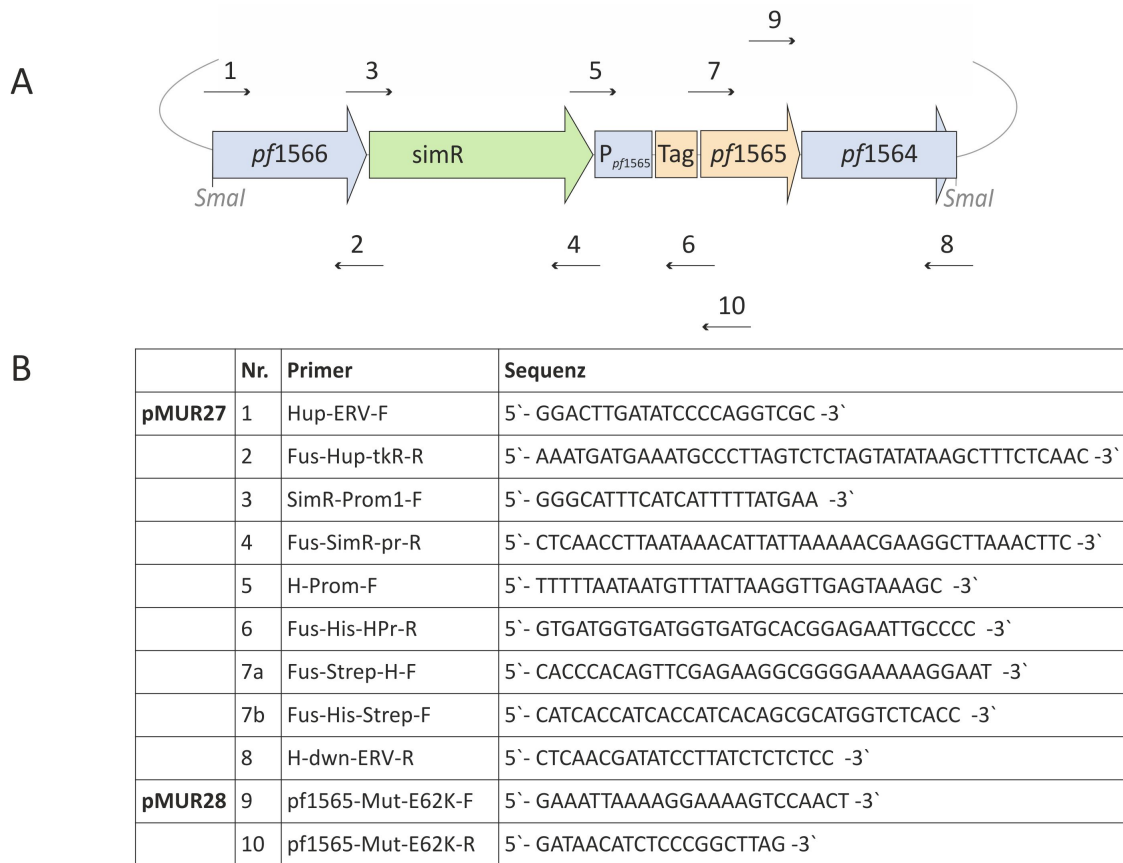


Abbildung 4.2.: **Konstruktion der Plasmide pMUR27 und pMUR28.** A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung) und Restriktionsschnittstellen. Die Simvastatin-Resistenzkassette ist als hellgrüner Pfeil, der kodierende Bereich des mutierten Gens als hellroter Pfeil dargestellt. Proteintags sind als hellrote Rechtecke gekennzeichnet. Die homologen Sequenzen für die Rekombination ins Genom und der endogene Promotor sind als hellblaue Rechtecke und Pfeile abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

pMUR43 und pMUR54 Für die Erstellung von pMUR43 und pMUR54 (vgl. Abb. 4.3) wurde auf die vorher erzeugten Plasmide pMUR27 und pMUR28 zurückgegriffen. Analog beinhalteten daher auch die chimären *rp5H*-Konstrukte die Sequenzen für zusätzliche N-terminale Hexahistidin- und Streptavidin-Proteintags. Die Plasmide enthielten gleichfalls in identischer Weise die Simvastatin-Resistenzkassette aus *T. kodakarensis*-Sequenzen und die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen chromosomalen Bereiche von *rpoH* zur Ermöglichung der doppelten Crossing-Over-Ereignisse. Über PCR (Anhang 1.1) wurde die eukaryotische N-terminale Domäne mit den Primern Nr. 11+12 aus dem Komplementations-Konstrukt für Hefe pRS423-*rp5H'*(E197K) (bereitgestellt von Bettina Sommer) amplifiziert. Unter Ausschluss eines wenig konservierten Sequenzbereiches am N-Terminus von RpoH (vgl. Abb. 4.1) wurden die Plasmide pMUR27 und pMUR28 ansonsten vollständig über PCR (Anhang 1.1) mit dem Primerpaar Nr. 13+14 amplifiziert und je mit der N-terminalen *rpb5*-Domäne ligiert (Anhang 1.1). Dadurch entstanden die Plasmide der chimären *rp5H*-Fusionssequenzen mit E179K-Punktmutation (pMUR54) und ohne diese (pMUR43).

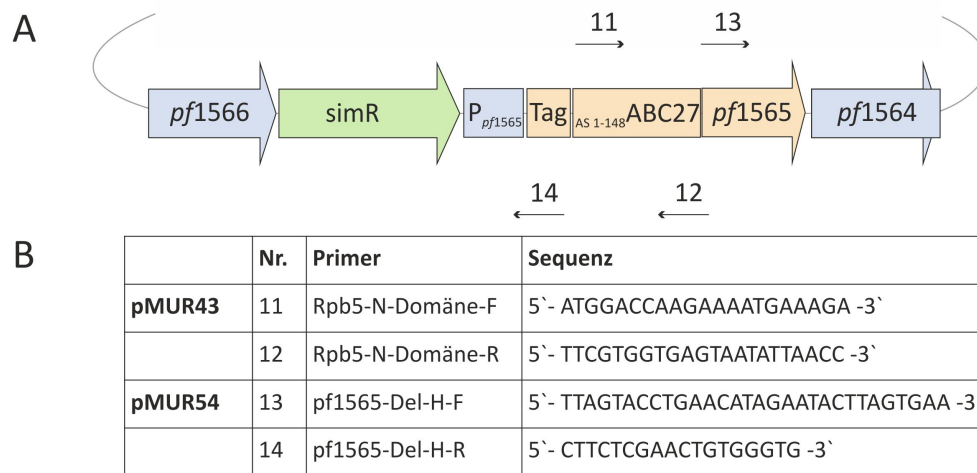


Abbildung 4.3.: **Konstruktion der Plasmide pMUR43 und pMUR54.** A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung). Die Simvastatin-Resistenzkassette ist als hellgrüner Pfeil, der kodierende Bereich des mutierten Gens als hellroter Pfeil dargestellt. Proteintags sind als hellrote Rechtecke gekennzeichnet. Die homologen Sequenzen für die Rekombination ins Genom und der endogene Promotor sind als hellblaue Rechtecke und Pfeile abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

Nach Transformation von pMUR43 und pMUR54 in *E. coli* DH5 α (Anhang 1.1) wurden die auf selektiven LB-Ampicillin Platten gewachsenen Klone mittels Kolonie-PCRs (Anhang 1.1) untersucht. Positiv getestete Klone wurde zur Plasmidisolierung (Anhang 1.1) angereichert und die präparierten Plasmide durch DNA-Sequenzierungen analysiert (Daten nicht gezeigt). Für die Transformation in *P. furiosus* wurden die verifizierten Plasmide pMUR43 und pMUR54 linearisiert. Die Transformation erfolgte nach vorher beschriebener Prozedur (Anhang 1.3). Mutanten wurden durch Selektion in Flüssigkulturmedium mit 10 μ M Simvastatin und anschließender Plattierung der Zellen auf Gelrite-Vollmedium-Platten mit 10 μ M Simvastatin isoliert. Bei Sequenzierungen der isolierten DNA der Klone und durch PCR-Analysen wurde deutlich, dass *Pyrococcus*-Mutanten mit den chimären *rp5h*-Konstrukten instabil waren (Daten nicht gezeigt).

4.3. Ergebnisse

Es sollten die Auswirkungen eines Aminosäureaustausches in der archaeellen RNAP-Untereinheit RpoH und einem chimären Rp5H-Fusionsprotein, bestehend aus der N-terminalen Domäne des eukaryotischen Rpb5 und RpoH als C-Terminus, untersucht werden. Hierfür wurden die Plasmide pMUR27, pMUR28, pMUR43 und pMUR54 erstellt, die entsprechende Modifikationen in *P. furiosus* etablieren sollten. Die bewährte Methode zur Selektion von *P. furiosus*-Transformanten über den Erwerb des Simvastatin-Resistenzmarkers wurde verwendet, um im Genom von *P. furiosus* das essentielle *pf1565*-Gen, welches zusätzlich das erste Gen eines Operons bildet, gegen veränderte und chimäre Genversionen zu ersetzen. Der genaue Aufbau der Konstrukte und die erwarteten Integrationsschritte ins Genom von *P. furiosus* sind im Verlauf des Kapitels detailliert dargestellt. Mit den erzeugten Mutanten wurde das Wachstum der RpoH E62K Mutante MURPf39 im Vergleich zum Kontrollstamm MURPf38 untersucht. Zusätzlich wurden auch *in vitro* Transkriptionsansätze zur unmittelbaren Beobachtung des Effekts der Aminosäuresubstitution in der RpoH-Untereinheit der RNAP von *P. furiosus* angefertigt.

4.3.1. Etablierung der *P. furiosus* RpoH-Mutanten

4.3.2. MURPf38 und MURPf39

Der für die Komplementation in Hefe essentielle Aminosäureaustausch E197K des untersuchten chimären Konstruktes sollte in der RpoH-Untereinheit der RNAP bei *P. furiosus* integriert werden. Die Mutation bewirkt die Substitution der Aminosäure Glutamat an Position 62 der Untereinheit durch einen Lysin-Rest. Dadurch wurde eine RpoH-Variante mit Substitution der Aminosäure an Position 62 der Untereinheit und einem zusätzlichen N-terminalen Hexahistidin- und Streptavidin-Proteintag erzeugt. Als Kontrolle wurde zudem ein Stamm ohne den Aminosäureaustausch an Position 62 von RpoH etabliert, in welchem folglich die wt RpoH-Untereinheit mit N-terminalen Hexahistidin- und Streptavidin-Proteintag exprimiert wird. Wie vorher beschrieben, wurden die Vektoren pMUR27 und pMUR28 in linearisierter Form durch Hitzeschock in *P. furiosus* transformiert (Anhang 1.3). Dabei wurden die Konstrukte in *P. furiosus* integriert, durch welche das endogene *rpoH* durch die modifizierten Versionen des Gens ersetzt wurde. Aus angefertigten Reinkulturen von MURPf38 und MURPf39 wurde genomische DNA isoliert (Anhang 1.1) und über PCRs (Anhang 1.1) die Sequenzabfolge des veränderten Chromosomenabschnitts analysiert. Zusätzlich wurden auch Sequenzanalysen der Amplikons angefertigt (Daten nicht gezeigt). Es wurde sichergestellt, dass, wie gewünscht, *rpoH* im Genom von *P. furiosus* durch die modifizierte Version des Gens substituiert wurde und die Veränderungen stabil im Genom nachweisbar sind (vgl. Abb. 4.4).

4.3.3. pMUR43 und pMUR54

Im Folgenden sollte nun getestet werden, inwiefern die eukaryotische N-terminale Erweiterung von *rpb5* im Zusammenhang mit der beschriebenen Aminosäuresubstitution das Wachstum von *P. furiosus* bzw. die Aktivität des veränderten Polymerasekomplexes beeinflusst. Hierfür wurden,

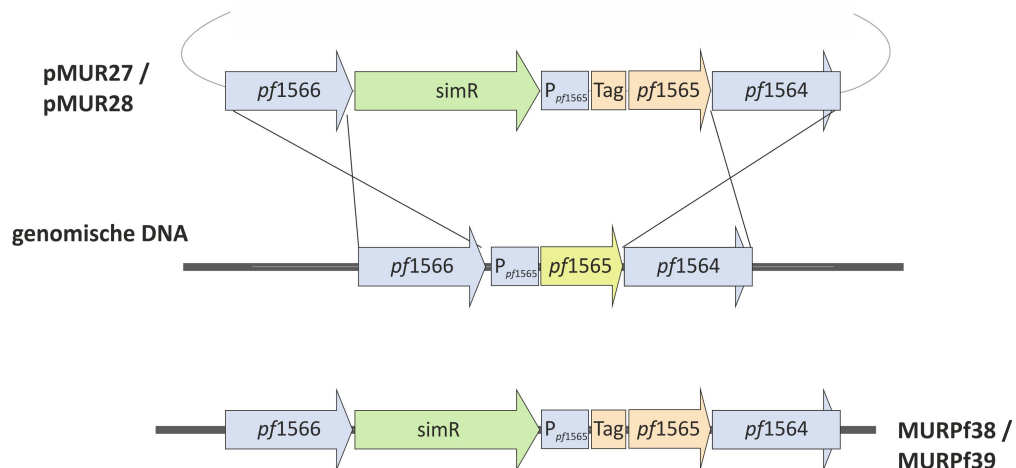
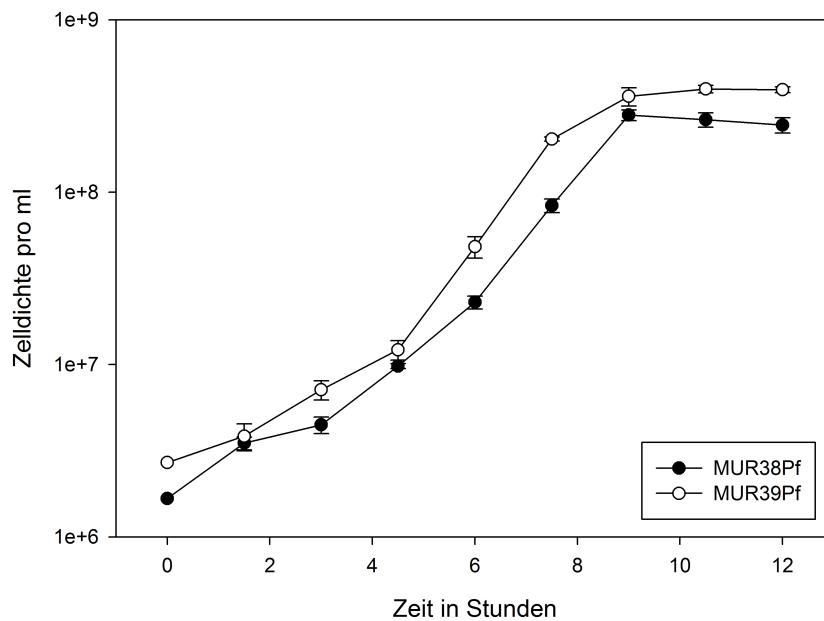


Abbildung 4.4.: Strategie zur Erzeugung von *P. furiosus* MURPf38 und MURPf39. Die Plasmide pMUR27 und pMUR28 enthalten zur homologen Rekombination die stromaufwärts- und stromabwärts flankierenden Sequenzen von *rpoH* (blau hinterlegte DNA-Bereiche) und die Simvastatin-Resistenzkassette (grün hinterlegter Genbereich) zur Selektion mit Simvastatin. Durch Transformation und Selektion wurden die Stämme MURPf38 und MURPf39 erzeugt, bei denen wt *rpoH* (gelb hinterlegter Genbereich) durch modifizierte Versionen substituiert wurden.

in Anlehnung an die erfolgten Komplementationsexperimente bei Hefe, chimäre Fusionskonstrukte aus dem N-terminalen Bereich von *rpb5* und dem archaeellen *rpoH* erstellt. Zum Zweck des Vergleichs wurden wiederum zwei Varianten -mit und ohne E197K-Modifikation- geschaffen. Es konnten jedoch keine stabilen *P. furiosus*-Stämme mit einer eukaryotischen N-terminalen Erweiterung von RpoH etabliert werden. Eine detailliertere Charakterisierung der DNA-Sequenzabfolge der Mutanten in dem veränderten chromosomalen Abschnitt deutet darauf hin, dass die Mutanten relativ zügig nach der Integration der chimären Konstrukte die N-terminale eukaryotische Erweiterung verlieren. Der Simvastatin-Resistenzmarker jedoch verbleibt bei den Mutanten stabil im Genom (Daten nicht gezeigt).

4.3.4. Vitalität der *P. furiosus* RpoH-Mutanten

Die Auswirkungen des Aminosäureaustausches in der RpoH-Untereinheit der RNAP von *P. furiosus* wurden bei den Mutanten MURPf38 und MURPf39 *in vivo* untersucht. Durch Aufzeichnung des Wachstumsverhaltens der Stämme wurde der Effekt der Expression der modifizierten RpoH-Untereinheiten auf die Vitalität der Zellen analysiert. Die Ansätze zur Studie des Wachstumsverhaltens wurden je als Triplets in 100-ml-Serumflaschen mit je 20 ml Medium unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Kulturflüssigmedien wurden auf eine Ausgangszellichte von etwa $2-3 \cdot 10^6$ Zellen/ml inokuliert und die Proliferation bei 95 °C über 12 Stunden dokumentiert. Für die Auftragung der Wachstumskurve wurden die statistischen Mittelwerte der Zellzahlen der analogen Ansätze berechnet und halblogarithmisch gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Wie in der Abbildung 4.5 dargestellt scheint Stamm MURPf39 mit dem Aminosäureaustausch E62K einen geringen Wachstumsvorteil gegenüber *P. furiosus* MURPf38 zu besitzen, der jedoch nur marginal ausgeprägt ist. Sowohl die durchschnittliche Generationszeit der Stämme während



Abbildungung 4.5.: Wachstumsverhalten von *P. furiosus* MURPf38 und MURPf39 auf SME-Medium mit 0,1 % Stärke, 0,1 % Hefeextrakt und 0,1 % Pepton bei 95 °C. Die Flüssigkulturmedien wurden mit identischen Vorkulturen auf eine Ausgangszelldichte von etwa $2\text{--}3 \times 10^6$ Zellen/ml inokuliert. Gezeigt sind Wachstumskurven von *P. furiosus* RpoH_{His/Strep} (MURPf38; ●) und *P. furiosus* RpoH_{His/Strep}E62K (MURPf39; ○). Die Berechnung der Zelldichten erfolgte mittels Thoma-Zählkammer (0,02 mm Tiefe, Marienfeld, Lauda-Königshofen).

Tabelle 4.1.: Generationszeit und maximale Zellzahlen von MURPf38 und MURPf39.

<i>P. furiosus</i> Stamm	Ø Generationszeit in min	Ø Max. Zellzahl pro ml
MURPf38	48	$2,9 \times 10^8$
MURPf39	42	$3,6 \times 10^8$

der exponentiellen Phase als auch die Abweichungen der maximal bestimmten Zellzahlen (vgl. Tabelle 4.1) lagen innerhalb der Standardabweichungen. So konnte *in vivo* kein signifikanter Effekt des E62K-Mutation in der RpoH-Untereinheit der RNAP von *P. furiosus* auf das Wachstum der Zellen ermittelt werden. Auch im weiteren Verlauf der Analysen der Mutanten konnte kein bedeutender Unterschied und somit auch kein Phänotyp festgestellt werden. Dennoch ist noch unklar, wodurch das Phänomen verursacht wird, dass MURPf39 geringfügig vitaler erscheint als MURPf38. Hierbei könnte es sich um eine normale Schwankung handeln, die bei biologischen Systemen vorkommen.




RNAP	<div> <div>RpoD_{His}</div> <div>RpoH_{His}</div> <div>RpoH_{His} E62K</div> </div>		
	1	2	3
run-off <i>gdh</i>			

Abbildung 4.6.: Unveränderte RNA-Syntheseleistung der modifizierten RpoH-RNAPs bei *in vitro* Transkriptionsexperimenten. Die Produktion eines 248 nt Run-off-Transkriptes am *gdh*-Promotor wurde auf einem 6%igen PA-Harnstoff-Gel untersucht. Die Transkription erfolgte unter Standardbedingungen (‘Standard-Methoden und Materialien’ 1.1) bei 80 °C für 10 Minuten. Die Spuren 2 und 3 zeigen die Transkriptionsaktivität der RpoH_{His} und RpoH_{His}E62K-RNAPs; die Spur 1 zeigt als Kontrolle den entsprechenden Ansatz mit Hexahistidin-getaggtter RpoD-RNAP.

4.3.5. Aktivität der modifizierten RNAP

Des Weiteren wurden *in vitro* Transkriptionsanalysen vorgenommen, um die Aktivität der modifizierten Polymerasen direkt zu untersuchen. Um ausreichend Zellmasse für die Reinigung der RNAPs zu erhalten, wurden mit den Stämmen *P. furiosus* MURPf38 und MURPf39 Großkulturen im 100-L-Maßstab produziert. Die Züchtungen fanden auf dem SME-Flüssigkulturmedium mit den Substraten 0,1 % Stärke, 0,1 % Hefeextrakt und 0,1 % Pepton in Anwesenheit von 10 µM Simvastatin bei 85 °C statt.

Isolierung der mutanten RpoH-RNAPs. Aus dem erhaltenen Zellmaterial der *P. furiosus*-Stämme MURPf38 und MURPf39 wurden für die Proteinreinigung Rohextrakte hergestellt. Die Zelllyse erfolgte durch Ultraschall und mittels Glasbeads an der Kugelmühle. Die Rohextrakte wurden des Weiteren einer DNase-Behandlung unterzogen und Zelltrümmer durch Ultrazentrifugation entfernt (Anhang 1.2). Die Reinigung der getaggtten Polymerasen aus den *Pyrococcus*-Rohextrakten fand nach dem beschriebenen Schema statt (Anhang 1.2). Mit Hilfe des zwei Schritte-Reinigungsprotokolls, bestehend aus Ni-NTA-Affinitäts- und anschließende Gelfiltrations-Chromatographie wurden reine und vollständig assemblierte RNAPs isoliert [Hupfer, 2012]. Abschließend wurden die Fraktionen konzentriert und nach der Kontrolle der Proteinzusammensetzung und Konzentrationsbestimmung der RNAP-Komplexe diese bei -80 °C gelagert.

***In vitro* Transkriptionsansätze.** Zur Bestimmung der Funktionalität der gereinigten RNAPs wurden entsprechend dem etablierten Protokoll (Anhang 1.1) promotorabhängige *in vitro* Transkriptionsansätze durchgeführt. Mit dem Einsatz identischer RNAP-Mengen sowie der archaeellen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB wurden an der *gdh*-Matrize einander entsprechende Mengen an Transkriptionsprodukt erzeugt (vgl. Abb. 4.6). Somit ist die Aktivität der RNAP mit der E62K-Punktmutation identisch mit der RNAP, welche die wt RpoH-Untereinheit enthält und dementsprechend auf Wildtypniveau. Es konnte kein Unterschied der Aktivitäten der RNAPs detektiert werden, weder zwischen den Polymerasen mit den Proteintags am N-Terminus der RpoH-Untereinheit und derjenigen die C-terminal an der RpoD-Untereinheit getaggt ist noch innerhalb der an der RpoH-Untereinheit modifizierten RNAPs (vgl. Abb. 4.6 Spuren 1 bis 3). In Übereinstimmung mit den, aus den Wachstumsanalysen gewonnenen Erkenntnissen kann davon

ausgegangen werden, dass der einfache Aminosäureaustausch von Glutamat an Position 62 der RpoH-Untereinheit durch einen Lysin-Rest keinerlei Einfluss auf die Aktivität der RNAP hat.

4.4. Diskussion

Rp5H und RpoH. Es zeigt sich, dass ein chimäres Fusionskonstrukt aus eukaryotischer N-terminaler Rpb5-Domäne und dem archaeellen RpoH als C-terminale Domäne (vgl. Abb. 4.3), welches in Hefe erfolgreich für Komplementationsansätze verwendet werden konnte, in *P. furiosus* nicht stabil ist. Das entsprechende Fusionskonstrukt wurde durch gerichtete Mutagenese modifiziert, sodass durch eine Basensubstitution (E197K) im Fusionsprotein Rp5H die Kompetenz zur Komplementierung eines Hefe-*rpb5*-Deletionsstammes YFN2 erzeugt wurde [Sommer, 2009]. Ein entsprechendes chimäres Konstrukt in *P. furiosus* konnte nicht erfolgreich etabliert werden. Hingegen kann allein die Punktmutation im archaeellen Abschnitt des Fusionskonstruktes, deren Einführung die Komplementation in Hefe ermöglicht hatte, auch bei *P. furiosus* stabil ins Genom integriert werden. Frühere *in vitro* Experimente mit rekonstituierter archaeeller RNAP ohne die RpoH-Untereinheit (Δ RpoH RNAP) deuteten auf eine essentielle Aufgabe der RpoH-Untereinheit für den Transkriptionsmechanismus hin. Zudem konnte durch die Rpb5-Untereinheit aus Hefe die Aktivität des rekonstituierten Δ RpoH-Enzyms wieder hergestellt werden [Grünberg *et al.*, 2010]. Obwohl die eukaryotische Rpb5-Untereinheit bei früheren *in vitro* Tests die Funktion von RpoH übernehmen konnte, erwies sich die Etablierung des chimären *rp5H*-Konstruktes im Genom von *P. furiosus* als nicht durchführbar. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache liegt hierbei in der mesophilen Natur der N-terminalen Rpb5-Hefedomäne im chimären Gebilde, die sensitiv gegenüber Denaturierung bei den hohen Wachstumstemperaturen von *P. furiosus* ist. Da die *in vitro* Experimente bei einer Temperatur von 70 °C und einer maximalen Inkubationszeit von 30 Minuten durchgeführt wurden [Grünberg *et al.*, 2010], sind dabei die Anforderungen an die Stabilität der Proteine wesentlich geringer als dies für langfristige bzw. permanent ablaufende zelluläre Prozesse in *P. furiosus* bei einer Temperatur von 95 °C der Fall ist. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte eine, durch Platzmangel auftretende Instabilität des Rpb5-Fusionsproteins sein. Durch die Addition einer N-terminalen Domäne an die RpoH-Untereinheit könnte theoretisch in der entsprechenden Region im assemblierten RNAP-Komplex sterische Hinderung entstehen. Diese Option ist jedoch relativ unwahrscheinlich, da gerade neuere Daten darauf hindeuten, dass bei Crenarchaeota der Bereich, der bei der Rp5H RNAP von dem N-terminalen Teil von Rp5H besetzt ist, entsprechend von einer zusätzlichen RNAP-Untereinheit, genannt Rpo13 [Wojtas und Abrescia, 2012, Wojtas und Abrescia, 2013], belegt wird, welche aber bei Euryarchaeota offensichtlich fehlt. Auch legt der Vergleich der Kristallstruktur einer crenarchaeotischen RNAP mit der Cryo-EM-Struktur der euryarchaeotischen RNAP von *P. furiosus* eine leicht zugängliche Region des RNAP-Komplexes nahe [Kusser *et al.*, 2008, Klein *et al.*, 2011, Wojtas und Abrescia, 2013].

Aminosäuresubstitution E62K. Im Gegensatz zum chimären Gebilde aus N-terminaler Rpb5-Hefedomäne und C-terminalem archaeellem RpoH war es möglich, die entsprechende einzelne Punktmutation E62K in der RpoH-Untereinheit stabil einzuführen. Bei der anschließenden Unter-

<i>Pyrococcus furiosus</i>	58	G D V I E I K R K S P T A G V Y Y Y R V V E D
<i>Pyrococcus abyssi</i>	58	G D I I E I K R K S P T A G V Y Y Y R V V E D
<i>Halobacterium salinarum</i>	52	G D V V E I V R D S R T T D E A V V Y R L V I E
<i>Aeropyrum pernix</i>	61	G D I I E I T R R S Y T A G E A K Y Y R F V V A Y Q K G V K
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	55	G D V V R I T R K S Q T A G E A D Y Y R L V I E
<i>Methanococcus vannielii</i>	52	G D I V K I T R K S Q T A G E T V Y F R L V V S N S V
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	60	G D I I K I T R K S P F T G E S V T Y R Y V I T G
<i>Sulfolobus shibatae</i>	60	G D I I R I I R K S Q L Y G E V V S Y R Y V I S G

Abbildung 4.7.: **Sequenzalignment von RpoH.** Multiples Sequenzalignment von RpoH-Sequenzen. Konservierte Aminosäuren sind in rot abgebildet, die Aminosäuren, welche der Position 62 von *P. furiosus* entsprechen sind durch eine hellrote Box markiert. Das MSA wurde mit Hilfe des Programms ClustalW2 erstellt.

suchung der *P. furiosus*-Mutante MURPf39 mit E62K-Substitution in der RpoH-Untereinheit der RNAP konnte kein signifikanter Effekt dieser Mutation auf das Wachstumsverhalten von *P. furiosus* festgestellt werden. Auch die *in vitro* Analyse der Aktivität des RNAP-Komplexes mit der modifizierten Untereinheit ergab keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Funktionalität der RNAP aufgrund dieser Veränderung. Die Analysen ergaben, dass durch die Substitution des Glutamats an Position 62 der exprimierten RpoH-Untereinheit durch Lysin weder ein deutlicher Effekt *in vivo* auf die Wachstumseigenschaften von *P. furiosus*, noch *in vitro* auf die Funktionalität der modifizierten RNAP verursacht wird. Die veränderte Untereinheit entspricht also dem Wildtyp. In diesem Zusammenhang soll die Gegenüberstellung der analogen Sequenzen der RNAP RpoH-Untereinheit im entsprechenden Bereich bei mehreren Archaeenarten helfen einen Einblick über das Auftreten dieser spezifischen Punktmutation zu erhalten (vgl. Abb. 4.7). Aufgrund des Sequenzvergleichs wird deutlich, dass an Position 62 hauptsächlich drei verschiedene Aminosäuren auftreten: Die negativ geladene Aminosäure Glutamat (E) ist dabei nur bei Vertretern der Ordnung *Thermococcales* zu finden, bei *Halobacterium* und bei *Aeropyrum pernix*. Bei allen anderen Archaea lokalisieren an dieser Position die positiv geladenen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K). Im Vergleich dazu treten an der entsprechenden Position bei Sequenzen der Untereinheit von Eukaryoten beinahe ausschließlich hoch konserviert die beiden positiv geladenen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) auf (Daten nicht gezeigt). Durch den Austausch der Aminosäure E62K kommt es zu einer Umkehrung der Ladung an dieser Stelle des Proteins. Eventuelle ionische Wechselwirkungen mit sterisch benachbarten Seitenketten im RNAP-Komplex, die auf der negativen Ladung des Glutamats beruhen, würden durch den Austausch mit Lysin, das positiv geladen ist, vermutlich abgeschwächt werden oder gehen gänzlich verloren.

Interaktionen. Durch eine detaillierte Mutationsanalyse in Hefe konnten enge Kontakte der Aminosäurereste in dem Bereich um die Position E197K mit der großen RNAP-Untereinheit Rpb1 ermittelt werden [Zaros *et al.*, 2007]. Obwohl eine genauere Untersuchung der Position K197 nicht durchgeführt wurde, deuten die zur Verfügung stehenden Daten auf eine strukturell wichtige Position hin, die möglicherweise an der Stabilisierung der Wechselwirkungen mit der Rpb1-Untereinheit über ionische Bindungen mit D1013 beteiligt ist. Da dieser Rest an der Kontaktfläche zu Rpb1 (bzw. RpoA') liegt, wird eventuell die Interaktion von Rpb5H mit dieser Untereinheit durch den selektierten Aminosäureaustausch E197K verbessert, wobei jedoch Details über die Art der Veränderung unbekannt sind. Da zudem die zur Verfügung stehenden Strukturdaten der Po-

lymerasen aus Hefe in dieser Region [Klein *et al.*, 2011, Wojtas und Abrescia, 2013] eine zu geringe Auflösung aufweisen bzw. nicht vollständig sind um sichere Aussagen über konkrete Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten der verschiedenen Untereinheiten zu erlauben, handelt es sich hierbei um Vermutungen. Wie bereits erwähnt liegen zurzeit von der RNAP aus *P. furiosus* keine Kristall-Strukturdaten vor. Als Vergleich werden, wie bereits genannt, die Daten der RNAP aus *S. solfataricus* herangezogen [Kusser *et al.*, 2008], welche jedoch an der relevanten Position die positiv geladene Aminosäure Arginin enthält.

Mutagenesestudien. Weiterhin deutet die Art der Aminosäuresubstitution an, dass anstelle der E197K-Mutation auch die Veränderung E197R bei dem chimären *rp5H*-Konstrukt geeignet sein sollte, um zur Komplementation in Hefe zu führen. Jedoch müssten für diesen Aminosäureaustausch zwei Basen des zugrunde liegenden Basencodons verändert werden anstatt nur eines Nukleotides, wie im Fall der analysierten E197K-Mutation. Hierfür ist jedoch die Wahrscheinlichkeit für deren Zustandekommen und Selektion nach vorwärts gerichteten Mutagenese-Ansätzen deutlich reduziert. Die insgesamt begrenzte Anzahl an weiter bearbeiteten und sequenzierten Mutanten einer Klonbibliothek und der große Anteil an unveränderten Klonen mit dem ursprünglichen, unveränderten Fragment als unvermeidlichen Hintergrund, erschweren die Identifikation von weiteren zusätzlichen Mutationen, welche eine Komplementation fördern, erheblich. Jedoch weist die Tatsache, dass die E197K Mutation oft selektioniert wurde, darauf hin, dass das Auftreten dieser Mutation an der endgültigen Trennung der C-terminalen Domäne zwischen Hefe und *Pyrococcus* beteiligt sein könnte. Die Tatsache, dass eine so geringfügige Veränderung wie eine Punktmutation ausreichend ist, um die Komplementation des chimären Gebildes in Hefe zu ermöglichen, verdeutlicht die zwischen den RNAPs der Archaeen und Eukaryoten bestehende evolutionäre Verwandtschaft. Des Weiteren deuten zudem die hier erhobenen Daten darauf hin, dass die Mutationsanalysen eine gute Plattform für die Identifizierung von wichtigen Mutationen auf molekularer Ebene darstellen.

Fazit. Es ist möglich durch einen einfachen Aminosäureaustausch ein *rp5H*-Fusionskonstrukt für die Komplementation eines *rpb5*-defizienten Hefestammes zu aktivieren. Bei *P. furiosus* hingegen konnte die endogene *rpoH*-Sequenz nicht gegen ein entsprechendes Fusionskonstrukt substituiert werden. Untersuchungen des *P. furiosus*-Stammes und der RNAP mit der RpoH-Untereinheit mit integriertem E62K-Aminosäureaustausch belegen, dass diese Mutation weder einen Einfluss auf die Vitalität des Stammes, noch auf die Aktivität der RNAP ausübt. Die RpoH E62K-Untereinheit ist damit in ihren Eigenschaften der wt RpoH-Untereinheit gleich. Mögliche, bisher nicht untersuchte Auswirkungen der Umkehrung der Ladung an der Position 62 durch den Aminosäureaustausch auf die Protein-Protein-Interaktionen der Untereinheit müssen ferner analysiert werden.

5. Optimierung des Chitinstoffwechsels

5.1. Einleitung

5.1.1. Chitin und Chitinasen

Das Polysaccharid Chitin dient hauptsächlich der Strukturbildung des Exoskeletts von Arthropoden, wie Insekten oder Krebstieren, wird auch von einigen Würmern und Weichtieren gebildet und ist Bestandteil der Zellwand von Pilzen [Gooday, 1999]. Chitin ist aus N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten (Abkürzung: GlcNAc) aufgebaut, die durch β -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind. Es unterscheidet sich von Cellulose nur durch die Acetamidogruppen anstelle der Hydroxygruppen, welche eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung zwischen angrenzenden Polymeren ermöglichen, was Chitin im Vergleich zur Cellulose stabiler macht. Jedoch variiert sowohl der Anteil der acetylierten Gruppen der Chitin-Ketten als auch der Polymerisationsgrad der Acetylglucosamin-Einheiten. Neben dem Polymerisationsgrad und dem Grad der Acetylierung hat auch die Konformation erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften des Chitinmoleküls. Chitin wird je nach tierischer Ursprungsart in verschiedenen Konformationen gebildet: Bei α -Chitin sind die Ketten in einer α -helikalen Spiralforn angeordnet, bei β -Chitin faltblattartig bestehend aus parallelen Strängen und als γ -Chitin wird ein Gemisch aus α - und β -Chitin bezeichnet.

Chitinasen sind Enzyme, die β -(1-4)-glykosidische Bindungen im Chitin hydrolysieren und sind innerhalb der Organismen aller Domänen weit verbreitet. Sie können anhand ihres Wirkungsspektrums entweder in Endochitinasen und Exochitinasen eingeteilt, oder basierend auf Aminosäuresequenzähnlichkeiten ihrer katalytischen Domänen den Familien 18, 19 und 20 der Glykosylhydrolasen zugeordnet werden [Henrissat und Bairoch, 1993, Henrissat und Bairoch, 1996]. Während Endochitinasen das Chitin zuerst durch zufällige Spaltungen in kleinere Einheiten zerlegen, verwerten die Exochitinasen hauptsächlich die verkürzten Chitin-Ketten und erzeugen daraus N-Acetylglucosamin-Monomere [Dahiya *et al.*, 2006]. Für die Einteilung anhand der Sequenzabstammung gilt, dass nahezu alle prokaryotischen und damit auch archaeellen Chitinasen zur Familie 18 gehören [Funkhouser und Aronson, 2007]. Die meisten der bekannten zehn euryarchaeotischen und einer crenarchaeotischen Chitinasen wurden dabei mit Hilfe von Sequenzvergleichen identifiziert und annotiert. Weitergehende Analysen über Aktivität und Struktur der Enzyme wurden bisher bei *Halobacterium* [García-Fraga *et al.*, 2013], *Sulfolobus* [Staufenberger *et al.*, 2012], *Thermococcus* und *Pyrococcus* [Tanaka *et al.*, 2001, Gao *et al.*, 2003, Andronopoulou und Vorgias, 2004] durchgeführt.

Das Enzym aus *T. kodakarensis* enthält neben einer putativen Signalpeptidsequenz (SP) zwei katalytische Domänen (A_{kat} und B_{kat}) und drei Chitinbindedomänen (ChBD), die durch Linkerdomänen miteinander verbunden sind [Tanaka *et al.*, 1999, Tanaka *et al.*, 2001]. Der Aufbau aus mehre-

ren katalytischen Domänen, welche aus $(\beta\alpha)_8$ -TIM-Barrel-Motiven gebildet werden, und ChBDs, die für die Substratbindung wichtig sind, ist typisch für Chitinasen der Familie 18 [Synstad *et al.*, 2004, Funkhouser und Aronson, 2007]. Die katalytische B-Domäne wirkt als Endochitinase und erzeugt Chitinoligomere. Die A-Domäne am entgegengesetzten Ende des Enzyms besitzt die Funktion einer Exochitinase und setzt aus den Chitin-Oligomeren Diacetylchitobiose frei. Der Abbau zu GlcNAc-Monomeren erfolgt im Zuge der Chitinolyse durch weitere Enzymaktivitäten [Tanaka *et al.*, 2004].

Im Vergleich hierzu wurden im Genom von *P. furiosus* zwei offene Leserahmen ermittelt, die für Chitinasen der Glykosidhydrolasefamilie 18 kodieren und die homolog zur ersten und zweiten Hälfte der einzelnen Chitinase von *T. kodakarensis* sind. Die Gene der beiden Chitin-abbauenden Enzyme ChiA (pf1234) und ChiB (pf1233) befinden sich nur 37 Nukleotide voneinander getrennt in gleicher Orientierung auf dem Chromosom [Gao *et al.*, 2003]. Struktur und Aktivität der Proteineinheiten PF1234 und PF1233 wurden durch NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie analysiert und der Substratumsatz der katalytischen Domänen untersucht [Nakamura *et al.*, 2005, Nakamura *et al.*, 2008, Tsuji *et al.*, 2010, Gao *et al.*, 2003]. ChiA enthält neben einer ChBD und einer katalytischen Domäne eine putative Signalpeptidsequenz am N-Terminus, die einen extrazellulären Wirkungsbereich vermuten lassen. Die Signalsequenz bildet drei Strukturmodule aus, welche charakteristisch bei Proteinen sind, die über das universelle Proteinsekretionssystem sezerniert werden [Albers *et al.*, 2006]. Da Chitotetraose und größere Chitinoligomere als Substrate erkannt und gebunden werden, könnte es sich bei ChiA somit um eine Endochitinase handeln [Gao *et al.*, 2003]. Auch ChiB besteht aus einer ChBD und einer katalytischen Domäne. Ein Signalpeptid ist hier nicht vorhanden [Gao *et al.*, 2003]. Angrenzend an die Bindedomäne befinden sich zwei Prolin-Threonin-reiche Linkersequenzen (PT-Linker). Die katalytische Domäne von ChiB (ChiB_{kat}) weist ein TIM-Barrel-Strukturmotiv auf und ein aktives Zentrum, das als spaltenförmige Region arrangiert ist. Beide Merkmale werden typischerweise bei Endochitinasen ausgebildet [Tsuji *et al.*, 2010]. Demnach sind ChiB_{kat} wie auch ChiA_{kat} Endochitinasen, die zentral gelegene glykosidische Bindungen der Chitin-Polymere hydrolysieren können [Tsuji *et al.*, 2010]. Da ein Signalpeptid in ChiB nicht identifiziert werden konnte, wird von einer intrazellulären Lokalisation des Enzyms ausgegangen. Der Vergleich von ChiA und ChiB aus *P. furiosus* mit dem Enzym aus *T. kodakarensis* verdeutlichen eine nahe Verwandtschaft von ChiB mit der katalytischen B-Domäne der Thermococcus-Chitinase (TK1765) und gemeinsame potentielle Funktionen als Endochitinasen. Jedoch handelt es sich bei TK1765 um ein extrazellulär wirksames Enzym, was zumindest für ChiB ohne N-terminale Signalsequenz nicht wahrscheinlich ist.

Eine Theorie zur Entstehung der ChiA- und ChiB-Chitinasen in *P. furiosus* ist schematisch in Abbildung 5.1 dargestellt [Oku und Ishikawa, 2006]. Durch ausgeprägte Homologien von ChiA und ChiB mit TK1765 erscheint plausibel, dass auch in *P. furiosus* ursprünglich nur eine einzelne Chitinase vorlag. Jedoch könnte die zufällige Insertion eines einzelnen Nukleotides an Position 1006 eine Verschiebung des Leserasters von ChiA verursacht haben, die wiederum zur Trennung beider Chitinase Gene geführt haben könnte. Im Bereich um Position 1006 befindet sich eine Folge von 7 Adenin-Nukleotiden. Wird nur ein Adenin entfernt, und somit die Verschiebung des Leserasters aufgehoben, entfällt das Stopcodon und es entsteht ein großer Genbereich [Oku und

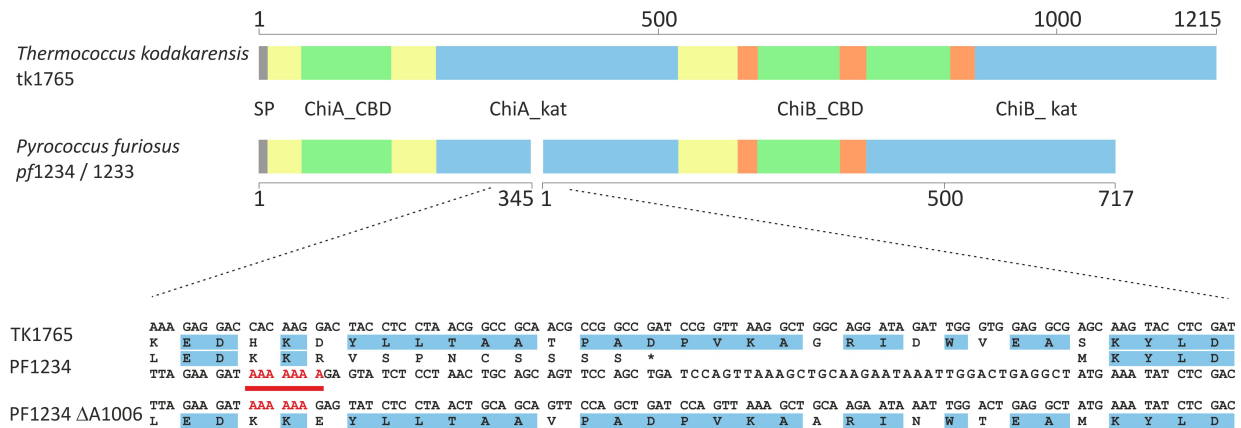


Abbildung 5.1.: Vergleich der Chitinasen aus *T. kodakarensis* und *P. furiosus*. Schematisches Modell der Domänen-Struktur beider Chitinasen, dem einzelnen Enzym aus *T. kodakarensis* und der gespaltenen Version aus *P. furiosus*. (SP= Signalpeptid; ChBD= Chitin-Bindedomäne; kat= katalytische Domäne). Das Alignment zeigt die Aminosäure und deren zugrundeliegenden DNA-Sequenzen der Region um die Position 1006 bei *T. kodakarensis* und *P. furiosus*. Für *P. furiosus* wurden darunter zusätzlich die durch die Deletion des Adenins an Position 1006 von *pf1234* veränderten Sequenzen angegeben. Identische Aminosäuren der Chitinasen sind blau hinterlegt. Die Position mit dem zusätzlichen Nukleotid wird durch einen roten Balken und Basen hervorgehoben. Das putative Stopcodon ist durch einen Stern gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach [Kreuzer *et al.*, 2013].

Ishikawa, 2006, Nakamura *et al.*, 2006]. Diese Theorie wird dadurch fundiert, dass sich das Stopcodon von *pf1234* innerhalb eines Sequenzbereichs befindet, der homolog zur katalytischen A-Domäne von TK1765 ist. Entfällt das Stopcodon entstünde eine korrigierte Aminosäuresequenz die eine 400 Aminosäuren lange hoch konservierte katalytische Chitinase-Domäne bilden könnte (vgl. Abb. 5.1). Rekombinant produzierte Domänen, sowie das Fusionsenzym aus ChiA und ChiB wurden auf ihre spezifischen Aktivitäten analysiert, wobei das fusionierte Enzym deutlich höhere Aktivität gegenüber kolloidalem Chitin zeigt als die nativen Formen [Oku und Ishikawa, 2006]. Darüber hinaus zeigte unter allen analysierten Teilenzymen ein Enzym, bestehend aus Chitinbindedomäne und katalytischer Domäne von PF1233 die höchste Aktivität gegenüber kolloidalem und kristallinem Chitin [Oku und Ishikawa, 2006]. Bisher durchgeführte Untersuchungen zur Wachstumsfähigkeit von *P. furiosus* auf Chitin lieferten kein eindeutiges Ergebnis. Tendenziell scheint Chitin nicht als Substrat für *P. furiosus* zu fungieren [Huber *et al.*, 1995, Driskill *et al.*, 1999, Gao *et al.*, 2003]. Weiterhin kann durch genauere Betrachtung des Aufbaus der putativen Chitinasen deren Funktionstüchtigkeit und damit die Verwertbarkeit von Chitin widerlegt werden.

5.1.2. Die markerlose Selektions-Strategie

Ziel war es durch Entwicklung und Anwendung einer markerlosen Selektionsstrategie [Schmutzler, 2011] bei *P. furiosus* ein Chitinase-Fusionsprotein zu erzeugen [Kreuzer, 2011]. Die Deletion der Baseninsertion bei *pf1234* sollte die Verschiebung des Leserasters korrigieren und somit zu einer funktionstüchtigen Chitinase in *P. furiosus* führen. Zusätzlich sollte eine *P. furiosus*-Mutante zur

Untersuchung der extrazellulären *in vivo* Aktivität des Teilenzyms ChiB gegenüber kristallinem Chitin erzeugt werden. Dafür sollte die Sequenz von ChiB (bestehend aus einer katalytischen sowie einer Chitinbindedomäne) auf genomischer Ebene an das Signalpeptid von ChiA fusioniert werden, wodurch die Chitin-Binde- und die katalytische Domäne ChiA sowie Teile von ChiB deletiert werden. Die Verwertung von Chitin als Substrat sollte beim erzeugten Stamm im Vergleich zum Wildtyp deutlich effektiver stattfinden.

Um weitere Manipulationen zur Optimierung des Chitinabbaus von *P. furiosus* durchführen zu können, sollten die beschriebenen Veränderungen durch die 'Pop-in/Pop-out'-Methodik ins Genom integriert werden. Grundlage für dieses Zwei-Schritt-Verfahren ist eine Kombination aus einem Positiv- und einem Negativselektionsmarker zur Manipulation des Genoms. Transformierte Zellen, welche die Markergen-kassette ins Genom integriert haben, werden im ersten Schritt über den verwendeten Positivselektionsmarker selektiert. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Agens, welches bei Zellen mit integriertem Negativselektionsmarker das Wachstum hemmt. Dadurch werden die Zellen angereichert, welche über Schleifenbildung der DNA und einer zweiten homologen Rekombination die Entfernung der Selektionsmarker vollzogen haben. Wie im Kapitel 'Allgemeine Einleitung' (1.2) erwähnt, wurde diese Strategie bei *T. kodakarensis* bereits verwendet, um Mehrfach-Mutanten erzeugen zu können [Santangelo *et al.*, 2010]. In diesem Zusammenhang wurde mittels Insertion einer *trpE-tk0664*-Genkassette bei einem Tryptophan-auxotrophen *T. kodakarensis*-Stamm das Gen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*hgpRT*; *tk0664*) aus dem Genom entfernt. Das im Salvage-Pathway vorkommende Enzym Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPRT, PF1950) katalysiert die Umwandlung der Basen Xanthin und Guanin in die Mononukleotid-Phosphate XMP und GMP. Auch das Basenanalogon 6-Methylpurin wird von dem Enzym als Substrat umgesetzt, das entstehende Produkt wirkt jedoch toxisch auf die Zellen. Durch Verwendung von Tryptophan-freiem Substrat wurden zuerst Zellen selektioniert, welche die Genkassette ins Genom über doppelten Crossing-Over und homologe Rekombination aufgenommen haben. Anschließend wurde durch Zugabe von 6-MP die markerlose Deletion von *tk0664* selektiert. Diese resultierte in einer signifikant höheren Resistenz der Zellen gegenüber dem Basenanalogon 6-Methylpurin, welches bei Umsetzung durch die XGPRT in Wildtypzellen toxisch wirkt. Diese Strategie der markerlosen Manipulation sollte nun auch bei *P. furiosus* geprüft und etabliert werden. Da für *P. furiosus* keine Auxotrophie-Mutante verfügbar ist, wird weiterhin das Gen der *hmgcr* als positiver Selektionsmarker verwendet. Die markerlose Deletionsmutante des Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gens (*pf1950*) soll anschließend als Ausgangsstamm für die Untersuchungen der Chitinase-Einheiten ChiA und ChiB genutzt werden.

5.2. Material und Methoden

Alle weiteren verwendeten Materialien und Methoden sind im Kapitel ‘Standard-Methoden und Materialien’ (Anhang 1.1) gelistet. Die erzeugten Plasmide und Mutanten wurden in die Klonbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Regensburg aufgenommen. Die durch DNA-Sequenzierung verifizierten Nukleotidabfolgen der erzeugten Plasmide und Mutanten wurden digital am Lehrstuhl für Mikrobiologie hinterlegt.

5.2.1. Bakterien- und Archaeenstämme

Stamm	Klonnummer	Merkmal/Hersteller
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MURPf27	ML Δ PF1950 (Karolin Schmutzler)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MURPf12	Δ XGPRT (Karolin Schmutzler)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MURPf23	ChiA Δ A1006-ML (Martina Kreuzer)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MURPf24	SP-ChiB (Martina Kreuzer)

5.2.2. Erzeugte Plasmide

Plasmid	Klonnummer	Merkmal/Hersteller
pUC19- Δ XGPRT	pMUR35	Deletion des Genlokus <i>pf</i> 1950 (Karolin Schmutzler)
pUC19	pMUR41	Klonierungsvektor mit zusätzlicher <i>Asc</i> I-Schnittstelle (Sven Vogel)
pUC19-ML- Δ XGPRT	pMUR37	zur markerlosen Deletion des Genlokus <i>pf</i> 1950 (Karolin Schmutzler)
pUC19-ML-ChiA Δ A1006	pMUR47	zur markerlosen Deletion eines Adenins am Genlokus <i>pf</i> 1234 (Martina Kreuzer)
pUC19-ML-SP-ChiB	pMUR50	zur markerlosen Integration eines ChiA-SP-ChiB _{kat} -Fusionsproduktes; Deletion der restlichen ChiA- und ChiB-Sequenzen (Martina Kreuzer)
pUC19 TKS _{im} R	pMUR62	Simvastatin-Resistenzkassette aus <i>T. kodakarensis</i>

5.2.3. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
6-Methylpurin	Sigma, St.Louis (USA)
Adenosintriphosphat	Fermentas, Burlington (CAN)
Chitin, flakes	Sigma, St. Louis (USA)
CM-Chitin-RBV	Loewe Biochemica, Otterfing
Chitin, powder	Sigma, St. Louis (USA)
Schwefel	Sigma, St. Louis (USA)

Der Reinheitsgrad der Chemikalien war in der Regel p.A. (pro Analysis).

Kits

Chemikalien	Bezugsquelle
Essigsäure UV Test	R-biopharm, Darmstadt
Ethanol UV Test	R-biopharm, Darmstadt
Stärke UV Test	R-biopharm, Darmstadt

5.2.4. Kultivierung von *P. furiosus* und *T. kodakarensis*

Aminosäure	Menge pro Liter	Lösungsmittel	Aminosäure	Menge pro Liter	Lösungsmittel
Alanin	75 mg	H ₂ O	Arginin	125 mg	H ₂ O
Asparagin	100 mg	1 N HCl	Aspartat	50 mg	1 N HCl
Cystein	250 mg	1 N NaOH	Glutamat	200 mg	1 N NaOH
Glutamin	200 mg	H ₂ O	Glycin	200 mg	H ₂ O
Histidin	200 mg	1 N HCl	Isoleucin	100 mg	H ₂ O
Leucin	100 mg	H ₂ O	Lysin	100 mg	1 N NaOH
Methionin	75 mg	1 N NaOH	Phenylalanin	75 mg	1 N NaOH
Prolin	125 mg	H ₂ O	Serin	75 mg	H ₂ O
Tryptophan	75 mg	1 N NaOH	Tyrosin	100 mg	1 N NaOH
Valin	50 mg	H ₂ O			

Aminosäure-Stammlösung 1x, Quelle: Sato 2003: Für eine 20x-Stammlösung die Aminosäuren zu geringem Volumen des jeweiligen Lösungsmittel geben. Die drei Lösungen werden nach Begasung mit N₂ in der Anaerobenkammer steril in eine gemeinsame, autoklavierte Schottflasche filtriert. Das Volumen in der Schottflasche wird zuletzt mit sterilem Wasser aufgefüllt. Stammlösung bei 4-6 °C dunkel lagern.

Chitin-Kulturmedium für *P. furiosus*

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	0,025 % (w/v)
Pepton	0,025 % (w/v)
Chitin, kristallin kolloidal	0,2-0,5 % (w/v)
SME, (pH 7,0, N ₂)	50 %

Zusätze für *T. kodakarensis*-Medium

Bestandteil	Menge
Wolfes Vitamine	0,2 ml
Uracil (5 mg/ml)	0,2 ml
20x Aminosäure-Stammlösung	1 ml
tyndallisierter Schwefel	0,2 %
1/2 SME, (pH 7,0, N ₂)	20 ml

Herstellung von kolloidalem Chitin (nach Reichenbach und Dworkin, 1981 [Reichenbach, 1981])

Zur Herstellung des kolloidalen Chitins wird Chitin aus Krabbenschalen in groben Flocken oder als Pulver (practical grade, Sigma-Aldrich) verwendet. 20 g Chitin unter ständigem Rühren zu mindestens 200 ml 37 % HCl (gekühlt auf 4 °C) gegeben. Nach etwa einer Stunde die Lösung mit 1 Liter 4 °C kaltem H₂O bidest. mischen (das Chitin fällt als weiße Flocken aus). Das Chitin durch Filtration mit einem Faltenfilter (311853, Schleicher und Schüll, Dassel) konzentrieren und wiederholt mit je 1 Liter H₂O bidest. waschen bis ca. pH-Wert 4 vorliegt. Die Suspension mit NaOH auf pH 7,0 neutralisieren und erneut mehrmals waschen. Das filtrierte, kolloidale Chitin trocknen, autoklavieren und bis zur Verwendung bei 4 °C lagern.

Analyse der Substratumsetzung von *P. furiosus*-Chitinmedium

Zur Bestimmung des ATP-Gehalts der Zellen wurden Rohextrakte, wie im Kapitel 'Standard-Methoden und Materialien' (1.2) beschrieben, erstellt. 0,5 ml einer *Pyrococcus*-Kultur wurden zentrifugiert (3 min, 10.000 g), das Zellpellet wiederholt mit 0,8 ml PBS-Puffer gewaschen und zuletzt in 200 µl PBS-Puffer unter Verwendung von Glaspartikeln und einer Kugelmühle (FastPrep-24, M.P. Biomedicals, Irvine, CA) aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation (10.000 g für 3 min bei 4 °C) erfolgte die Quantifizierung der ATP-Menge im Überstand durch ein Luciferin/Luciferase Assay (FluoProbes, Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich) an einem Luminometer (Junior LB 9509, Berthold Technologies, Bad Wildbad), entsprechend den Herstellerangaben. Die Menge an Acetat im Überstand der Kulturmedien wurde aus 0,5 ml *Pyrococcus*-Kultur durch ein Test-Kit zur enzymatischen Bestimmung des Acetatgehalts (R-biopharm, Darmstadt) den Empfehlungen des Herstellers folgend analysiert.

PBS-Puffer: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ × 7H₂O 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM

5.2.5. Durchführung der Selektions- und Gegenselektionsstrategie

Die Hitzeschock-Transformationen von *P. furiosus* wurden grundsätzlich wie im Kapitel 'Standard-Methoden und Materialien' (1.3) dargestellt durchgeführt. Die DNA-Konstrukte für die doppelten Crossing-Over-Ereignisse wurden vor der Transformation linearisiert. Die Plasmide zur Integration über einfaches Crossing-Over wurden zirkulär eingesetzt. Die MURPf27 Transformationsvorkulturen wurden für besseres Wachstum und ausreichende Zelldichten zusätzlich mit 0,8 mM IMP+GMP (Inosinmonophosphat + Guanosinmonophosphat) angezogen. Zur Erzeugung der Zwischenmutante mit komplett im Genom integriertem DNA-Konstrukt wurden die Zellen nach der Transformanten mit 10 µM Simvastatin in SME-Flüssigkulturmedium bei 85 °C für 48 Stunden selektioniert. Die Zellen wurden anschließend auf Gelrite-Vollmedium-Platten mit 10 µM Simvastatin vereinzelt, um Reinkulturen der intermediären Mutante anzufertigen. Die Integration der transformierten DNA ins Genom wurde über PCR-Ansätze mit isolierter genomischer DNA überprüft. Durch einen zweiten Selektionsschritt wurde anschließend die Entfernung der Marker- und Zielgene aus dem Genom der Zwischenmutante induziert. Für die vollständige Entfernung aller Simvastatin-Bestandteile vor Durchführung der Gegenselektion wurden die Zellen der verifizierten Intermediär-Mutante mehrmals unter anaeroben Bedingungen mit Flüssigkulturmedium ohne Simvastatin gewaschen. Dazu wurden 1,5 ml Kultur anaerob zentrifugiert (4 min bei 6.000 g) und in 1,5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Waschprozedur wurde dreimal wiederholt und im Anschluss zwei aufeinanderfolgende 20-ml-Flüssigkulturen in Vollmedium ohne Selektionsdruck angefertigt. Die Negativselektion der Zwischenmutante erfolgte in Flüssigmedium (0,2 % Hefeextrakt, keine Stärke, kein Pepton) mit 6-Methylpurin (1 mM) und Vereinzelung auf Gelriteplatten mit 50 µM 6-MP. Damit wird eine zweite homologe Rekombination innerhalb einer DNA-Schleife forciert, durch die das *xgprt*-Gen aus dem Genom entfernt wird um die Bildung toxischer Produkte zu verhindern. Der Genotyp, der durch 6-MP-Ausplattierung erzeugten Reinkulturen wurde mit isolierter genomischer DNA durch PCRs und Southern Blot-Experimente bestätigt.

6-Methylpurin

6-Methylpurin: MW = 143,14 g/mol; Endkonzentration 10 mM: 54 mg in 40 ml H₂O; Steril-Filtration (Porengröße 0,2 µm) und Aufbewahrung in N₂ begaster Serumflasche

Hefe-Kulturmedium für *P. furiosus* zur Selektion mit 6-Methylpurin

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
SME, (pH 7,0, N ₂)	50 %

5.2.6. DNA-Manipulationen und Plasmid-Konstruktionen

pMUR35 Für die Erzeugung der *P. furiosus*-pf1950-Deletionsmutante wurde das Simvastatin-Resistenzgen mit den etwa 1000 bp langen Fragmenten des stromaufwärts und stromabwärts flankierenden chromosomalen Bereiches von pf1950 fusioniert [Schmutzler, 2011]. Zur Vermeidung von Rekombinationsereignissen im Markergenbereich wurde auf das *hmgcr*-Gen aus *T. kodakarensis*, tk0914, zurückgegriffen. Wie in Abbildung 5.2 dargestellt, erfolgte die Amplifikation der drei Fragmente mit den Primerkombinationen Nr. 1+2, 3+4 und 5+6 aus genomischer *P. furiosus*-DNA (Präparation vgl. Anhang 1.1) und pUC19 TKSImR. Nach der Fusion der einzelnen Fragmente mittels Überhang-PCRs ('Materialien und Methoden' 1.1) und den Primern Nr. 1+4 wurde das DNA-Konstrukt über zusätzliche *Acc65I*- und *PstI*-Restriktionsschnittstellen in einen pUC 19-Vektor integriert. Der fertig gestellte Vektor wurde in *E. coli* 10-β Zellen transformiert und erhaltene Klone mittels Kolonie-PCR analysiert. Anschließend erfolgte die Isolierung des Plasmids und eine Überprüfung durch Restriktionshydrolyse und DNA-Sequenzierung. Wie früher beschrieben (Anhang 1.3), wurde der verifizierte Vektor in linearisierter Form durch Hitzeschock in *P. furiosus* transformiert und mit 10 µM Simvastatin selektioniert. Aus einer daraus angefertigten Reinkultur wurde genomische DNA isoliert und über PCR die Komposition des veränderten Chromosomen-Abschnitts analysiert. Dabei wurden Primer, die innerhalb des Genbereichs von pf1950 bzw. tk0914 liegen, mit Primern, die außerhalb der veränderten Region binden (Primer Nr. 7-10), kombiniert. Die durch wt *P. furiosus*-DNA und Mutanten-DNA erhaltenen Amplikons wurden miteinander und mit den erwarteten Fragmentgrößen verglichen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass, wie gewünscht, pf1950 im Genom von *P. furiosus* durch die Simvastatin-Resistenzkassette (tk0914) substituiert und der Stamm *P. furiosus* ΔXGPRT (MURPf12) erzeugt wurde.

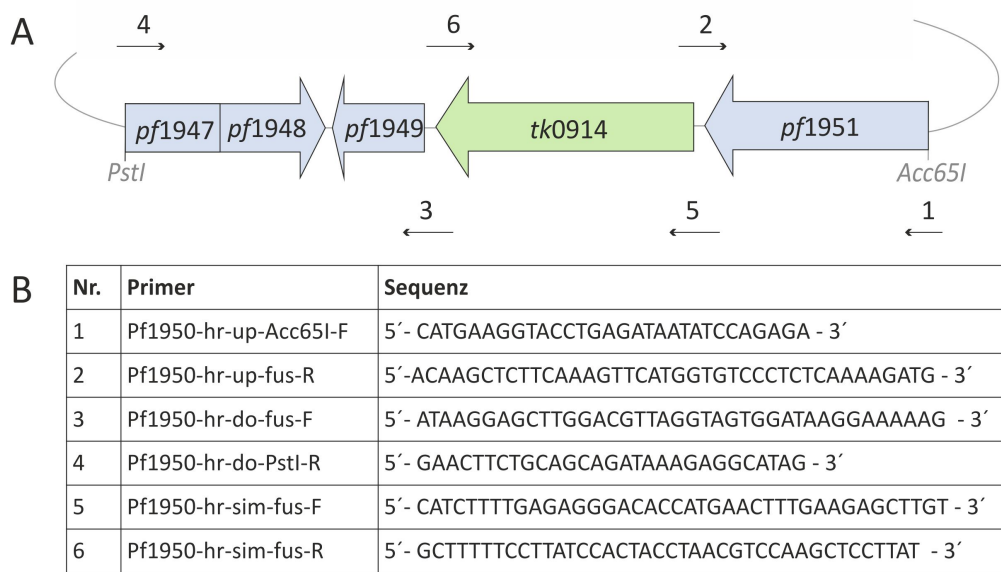


Abbildung 5.2.: **pMUR35**. Konstruktion des Plasmids pMUR35. A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung) und den Restriktionsschnittstellen. Das Simvastatin-Resistenzgen ist als hellgrüner Pfeil dargestellt. Die homologen Sequenzen für die Rekombination ins Genom sind als hellblaue Rechtecke und Peile abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

Primer zur Verifizierung von MURPf12

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
7	Pf1950-out-F	5'- CAATCTTCCTGAAGAGTGGAT -3'
8	Pf1950-out-R	5'- CTAGGCTAATAACCCCTAGTAGAGAA -3'
9	Pf1950-1950-up-F	5'- ACATAGAGAACTGGGCTAAGGC -3'
10	Pf1950-1950-do-R	5'- GAACTTCAATGCCGTGTAGCTC -3'

pMUR37 Nachdem sichergestellt war, dass es sich bei *pf1950* nicht um ein essentielles Gen handelt, sollte eine markerlose Deletion von *pf1950* in *P. furiosus* erzeugt werden. Dazu wurde das Plasmid pMUR37 generiert [Schmutzler, 2011]. pMUR37 enthält drei DNA-Fragmente bestehend aus den chromosomalen stromaufwärts- und stromabwärts-Regionen (mit etwa 400 und 1500 bp Länge) von *pf1950* sowie der Simvastatin-Resistenzkassette. Diese besteht aus dem ORF der *hmg-cr* aus *T. kodakarensis* unter Kontrolle von Promotor- und Terminatorsequenz der *gdh* (*tk1431*) und wird bei der Selektion der Zellen mit Simvastatin eingesetzt. Wie in Abbildung 5.3 dargestellt, erfolgte die Amplifikation der drei Fragmente mit den Primerkombinationen Nr. 11+12, 13+14 und 15+16 mit genomischer DNA aus *P. furiosus* und pMUR62. Die Fragmente wurden mit Überhang-PCR verbunden und das, mittels der Primer Nr. 11+16 fusionierte finale Konstrukt nach *Bam*HI- und *Sac*I-Restriktionshydrolyse in die entsprechenden Schnittstellen eines pUC 19-Vektors ligiert. Nach Transformation in *E. coli* 10- β erfolgte eine Selektion auf LB-Platten mit XGal, IPTG und

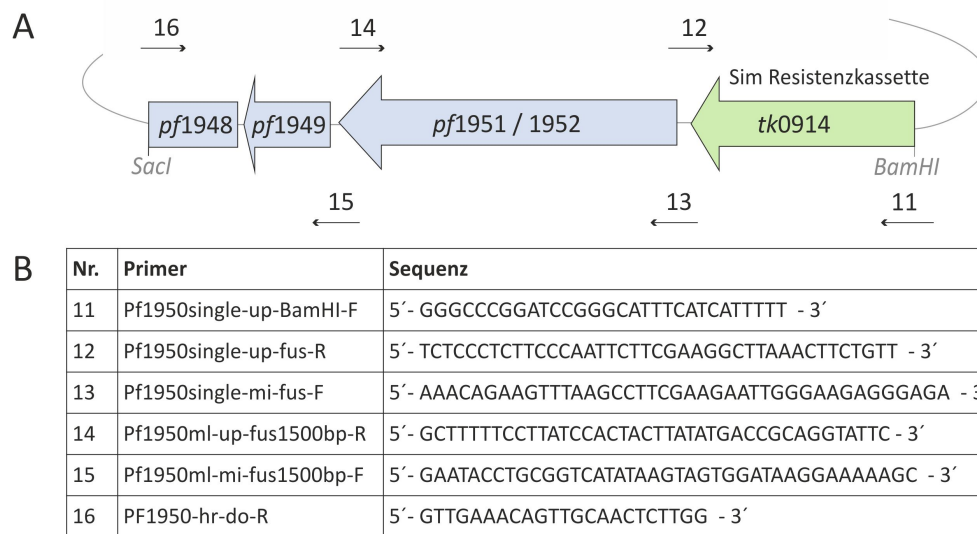


Abbildung 5.3.: **pMUR37**. Konstruktion des Plasmids pMUR37. A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung) und den Restriktionsschnittstellen. Die Simvastatin-Resistenzkassette ist als hellgrüner Pfeil dargestellt. Die homologen Sequenzen für die Rekombination ins Genom sind als hellblaue Rechtecke und Pfeile abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

Amp. Einige Kolonien wurden anschließend mit Hilfe von Kolonie-PCR analysiert. Nach der Plasmidpräparation wurde der korrekte Aufbau von pMUR37 durch Restriktionshydrolyse mit *NcoI* und Sequenzierung der Plasmid-DNA untersucht. Nach Verifizierung der Plasmidsequenz wurde pMUR37 zirkulär, durch die beschriebene Hitzeschock-Prozedur in *P. furiosus* transformiert (Anhang 1.3). Die Strategie zur Selektion der Transformanten mit Simvastatin zur Erzeugung der Intermediär-Mutante und der späteren Gegenselektion mit 6-MP zur Kultivierung der markerlosen Mutante wurde, wie im Kapitel 'Materialien und Methoden' (5.2.5) dargestellt, angewendet. Der Genotyp einer durch die 6-MP Ausplattieren erzeugten Reinkultur wurde mittels isolierter genomischer DNA durch PCR und Southern Blot Experimente analysiert. Für diese wurde die DNA aus wt *P. furiosus* und MURPf27 einer Restriktionshydrolyse mit *BstXI* unterzogen. Durch Digoxigenin-markierte DNA-Sonden gegen die Genbereiche von *pf1950* und *tk0914* sowie eine chromosomal stromaufwärts von *pf1950* gelegene Sequenzregion wurde die Präsenz der jeweiligen Bereiche in den DNAs nachvollzogen. Zusätzlich wurde der korrekte Verlauf der Plasmid-Integration und späteren Entfernung mittels homologer Rekombination durch PCR-Analysen (Primer Nr. 7-10, 17+18) und Sequenzierung der entsprechenden DNA-Fragmente untersucht (Daten nicht gezeigt).

Primer zur Verifizierung von MURPf27

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
17	Pf1950-SB-up-F	5'- CTCTGGATGAGGCATACCTTTC -3'
18	Pf1950-SB-up-R	5'- CTAATGATAACTGGGAGGAGCC -3'

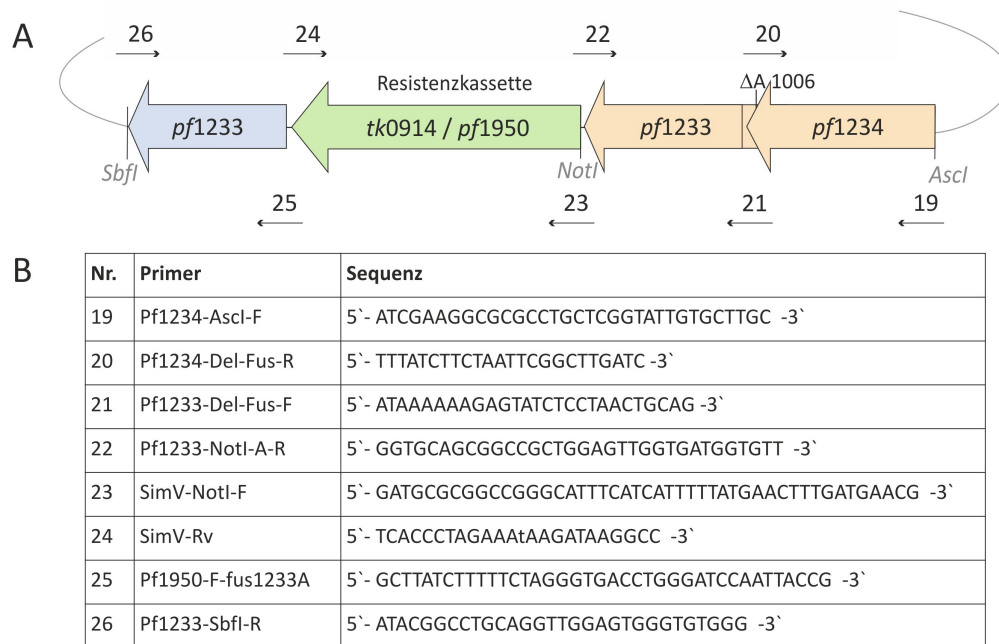


Abbildung 5.4.: **pMUR47**. Konstruktion des Plasmids pMUR47. A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung). Die Simvastatin-Resistenzkassette ist als hellgrüner Pfeil, die kodierenden Bereiche des mutierten Gens als hellrote Pfeile dargestellt. Der homologe Bereich für die Rekombination ins Genom ist als hellblauer Pfeil abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

pMUR47 Als Ausgangsvektor für die im Folgenden beschriebenen Konstrukte wurde das Plasmid pMUR41 [Vogel, 2011] verwendet. Dieses modifizierte pUC19-Plasmid enthält eine Resistenzkassette, welche über Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *SbfI* und *AscI* integriert wurde. Die Resistenzkassette besteht aus folgenden Gensequenzen: Der Promotor der Glutamatdehydrogenase *gdh* (*pf1602*) und die *hmgcr* (*tk0914*) aus *T. kodakarensis*. Aus *P. furiosus* stammen eine zusätzliche Ribosomenbindestelle, die Sequenz der Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase *xgprrt* (*pf1950*) und der Terminationsbereich des Histon A1 Gens (*pf1831*). Der Vektor pMUR47 wurde zur Integration der Punktmutation durch ein doppeltes Crossing-Over-Ereignis geschaffen [Kreuzer *et al.*, 2013]. In pMUR47 wurden die Sequenzen für ChiA, *pf1234*, und dem 5'-Bereich von ChiB, *pf1233a* mit der Resistenzkassette sowie dem zweiten Teil der ChiB-Gensequenz (*pf1233b*) durch Überhang PCR kombiniert. Wie in Abbildung 5.4 dargestellt wurden die Einzelfragmente durch die Primerkombinationen Nr. 19+20 und 21+22 aus genomischer *P. furiosus* DNA und pMUR41 erstellt und die Fragmente mit den Primern 19+22 verknüpft. Das zweite durch Überhang-PCR erzeugte DNA-Fusionsprodukt enthielt die Resistenzkassette mit den beiden Markergenen der *hmgcr* und der *xgprrt* (Primer Nr. 23+24), sowie den zweiten Teil der ChiB-Gensequenz (*pf1233b*) (Primer Nr. 25+26). In diesem Fall wurde gleichfalls durch die Primer Nr. 23 und 26 eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle vor die Resistenzkassette und eine *SbfI*-Schnittstelle am Ende von *pf1233b* integriert. Beide DNA-Fusionsfragmente wurden über die gemeinsame *NotI*-Restriktionsschnittstelle verbunden. Die Insertion des gesamten DNA-Konstruktes in den Vektor pMUR41 [Vogel,

2011] fand über dessen *AscI*- und *SbfI*-Restriktionsschnittstellen statt. Dafür wurde das DNA-Fragment gereinigt und in einem Kombinationsansatz aus Restriktionshydrolyse und Ligation mit *AscI*- und *SbfI*-hydrolysierten pMUR41-Plasmid eingesetzt.

Nach Transformation von pMUR47 in *E. coli* DH5 α wurden die auf selektiven LB-Ampicillinplatten gewachsenen Kolonien mittels Kolonie-PCR untersucht. Ein positiv getesteter Klon wurde zur Plasmidisolierung angereichert und das präparierte Plasmid durch Restriktionsanalysen mit *AscI*, *NotI* und *SbfI* sowie DNA-Sequenzierungen untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die Deletion der Base an Position 1006 nicht erfolgt war. Da jedoch das Konstrukt korrekt fusioniert und ohne weitere Fehler war, wurde das Plasmid für eine ortsspezifische Mutagenese zur Entfernung der genannten Base genutzt. Nach erneuter Ligation, Transformation in *E. coli* DH5 α und Selektion der Klone konnte die gezielte Deletion eines Adenins durch DNA-Sequenzierung des Plasmids pMUR47 bestätigt werden. Für die Transformation in *P. furiosus* ML Δ XGPRT (MURPf27) wurde pMUR47 mit *AscI* und *SbfI* linearisiert. Die Transformation (Anhang 1.3) sowie Selektion und Gegenselektion (5.2.5) erfolgten nach beschriebenen Prozeduren. Mit den auf 6-Methylpurin-Platten gewachsenen Kolonien wurden Flüssig-Reinkulturen zur Präparation genomischer DNA erstellt. Mittels PCR (Primer Nr. 27-30) und Sequenzierung der isolierten DNA wurde der Genotyp des erzeugten Stammes *P. furiosus* ChiA Δ A1006-ML (MURPf23) untersucht und die markerlose Deletion der Base an Position 1006 bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Primer zur Verifizierung von pMUR47 und MURPf23

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
27	Pf1234-Del-F	5'- AAAGAGTATCTCCTAACTGCAGCAGTTC -3'
28	Pf1234-Del-R	5'- P-TTTATCTTCTAATTCGGCTTGATCAAATAT -3'
29	PF1234-link-F	5'- GGATGGCCTTGACATTGACT -3'
30	PF1233-link-R	5'- CATAAGGAGCATTCGGATC -3'

pMUR50 Das Plasmid pMUR50 wurde zur Rekombination über ein einfaches Crossing-Over hergestellt, welches folglich durch die Selektion induziert zuerst komplett ins Genom integriert werden soll. Dazu wurde ein DNA-Fragment mit dem stromaufwärts gelegenen Promotorbereich von *pf1234* und dessen Signalpeptidsequenz via Überhang-PCR mit einem Fragment, welches für die katalytische Domäne von ChiB kodiert, fusioniert. Auch in diesem Falle wurde zur Erstellung des Plasmids und der veränderten Chitinase-Einheit die im oberen Abschnitt bereits detailliert beschriebene Resistenzkassette (*tk0914-pf1950*) und der modifizierte pUC 19-Vektor (pMUR41; [Vogel, 2011]) sowie genomische *P. furiosus*-DNA verwendet. Wie in Abbildung 5.5 dargestellt, wurden die Einzelfragmente durch die Primerkombinationen Nr. 31+32, 33+34 und 35+36 erstellt und die ersten beiden Fragmente mit den Primern 31+42 verknüpft. Analog zur Vorgehensweise bei pMUR47 wurde auch hier das DNA-Fusionsfragment über die gemeinsame

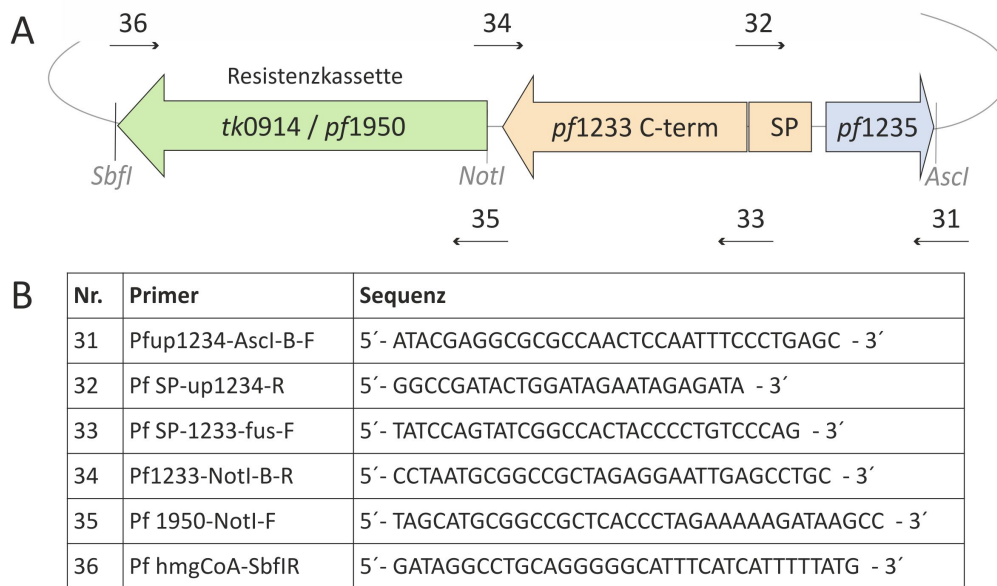


Abbildung 5.5.: **pMUR50**. Konstruktion des Plasmids pMUR50. A) Übersicht des Fusionsproduktes mit den verwendeten Primern (Angabe der Primernummer und Orientierung) und den Restriktionsschnittstellen. Die Simvastatin-Resistenzkassette ist als hellgrüner Pfeil, der kodierende Bereich des mutierten Gens als hellroter Pfeil dargestellt. Das Signalpeptid (SP) ist als hellrotes Rechteck gekennzeichnet. Die homologe Sequenz für die Rekombination ins Genom ist als hellblauer Pfeil abgebildet. B) Liste der verwendeten Primer mit Namen und Sequenz.

NotI-Restriktionsschnittstelle mit der Resistenzkassette verbunden. Auch die Insertion des gesamten DNA-Konstruktes in den Vektor fand über die *AscI*- und *SbfI*-Restriktionsstellen statt. Dafür wurde das gereinigte DNA-Fragment in einem Kombinationsansatz aus Restriktionshydrolyse und Ligation mit *AscI* und *SbfI* hydrolysiertem pMUR41-Plasmid eingesetzt. Nach erfolgter Ligation und Transformation von pMUR50 in *E. coli* DH5 α wurden die auf selektiven LB-Ampicillin-Platten gewachsenen Kolonien mittels Kolonie-PCR analysiert. Ein positiv getesteter Klon wurde zur Plasmidisolierung angereichert und das präparierte Plasmid durch Restriktionsanalysen sowie DNA-Sequenzierungen untersucht. Die Sequenzdaten bestätigten die korrekte Konstruktion des Vektors; eine entstandene Punktmutation im nicht kodierenden Bereich stromaufwärts von *pf1234* wurde für das weitere Vorgehen vernachlässigt. Für die Transformation in *P. furiosus* ML Δ XGPRT (MURPf27) wurde pMUR50 zirkulär eingesetzt. Die Transformation erfolgte nach vorher beschriebener Prozedur (Anhang 1.3). Nach Selektion und Gegenselektion (5.2.5) wurde bei einer Reinkultur genomische DNA isoliert und mittels PCR (Primer Nr. 31-36, 9+10) und DNA-Sequenzierung der Genotyp der erzeugten Mutante MURPf24 verifiziert.

5.3. Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob durch eine einfache Basensubstitution im Genom *P. furiosus* die Fähigkeit erlangt Chitin abzubauen, wurde anhand von Enzym-Optimierungs-Experimenten bei der Chitinase ein auf Selektion/Gegenselektion basierendes, markerloses genetisches System etabliert. Als Grundlage für künftige Mehrfachdeletionen bei *P. furiosus* sollte zuerst ein Stamm erstellt werden, in dem der Genbereich der *xgprt* *pf*1950 aus dem Chromosom entfernt wurde, ohne dabei das verwendete Markergen *hmgcr* zur positiven Selektion im Genom zu erhalten. Durch das Fehlen der XGPRT sollen die Zellen die Resistenz gegenüber 6-Methylpurin (6-MP) aufweisen, was den Einsatz von *pf*1950 als Negativ-Selektionsmarker ermöglicht. Ausgehend von dem Stamm *P. furiosus* ML Δ PF1950 sollten zwei Stämme zur Analyse der Chitinverwertung bei *P. furiosus* erzeugt werden. Durch Deletion einer Baseninsertion in der katalytischen Domäne der Chitinase-Einheit ChiA in *P. furiosus* sollte der Stamm *P. furiosus* ChiA Δ A1006 mit einer fusionierten Chitinase homolog zu *T. kodakarensis* erzeugt werden. Eine weitere Mutante, *P. furiosus* SP-ChiB, sollte der Untersuchung der Aktivität einer Variante des Teilenzym ChiB dienen.

5.3.1. *P. furiosus* ML Δ PF1950 (MURPf27)

Zur Anwendung der Gegenselektions-Strategie ist die Verfügbarkeit von jeweils mindestens einem positiven und negativen Selektionsmarker essentiell. Als positiver Selektionsmarker konnte bisher eine Resistenzkassette zur Produktion der HMGCRC bei *P. furiosus* erfolgreich eingesetzt werden. Negative Selektionsmethoden waren in der Arbeitsgruppe bei *P. furiosus* nicht weiter erprobt. Da sich der Einsatz des Gens der XGPRT als negativer Selektionsmarker bereits bei einigen verwandten Archaeenarten bewährt hat, sollte nun dessen Tauglichkeit für Transformations-Prozeduren bei *P. furiosus* geprüft werden. Da die Gegenselektions-Strategie schlussendlich die Entfernung des *xgprt*-Gens (*pf*1950) aus dem Genom bewirkt, musste vorab geklärt werden, inwieweit das Wachstum von *P. furiosus* durch die Deletion beeinflusst wird.

P. furiosus Δ XGPRT (MURPf12)

Daher wurde zunächst eine *pf*1950-Deletionsmutante erstellt, bei der das Gen für die XGPRT durch das Simvastatin-Resistenzgen substituiert wurde [Schmutzler, 2011]. Um die homologe Rekombination des Konstruktes ins Genom zu gewährleisten, wurde der *hmgcr*-Resistenzmarker mit etwa 1000 bp langen Fragmenten des stromaufwärts und stromabwärts flankierenden chromosomalen Bereiches von *pf*1950 fusioniert (vgl. Schema Abb. 5.6). Die DNA wurde in linearisierter Form durch Hitzeschock in *P. furiosus* transformiert und die Zellen anschließend selektioniert. Aus einer angefertigten Reinkultur wurde genomische DNA isoliert und über PCR die Komposition des veränderten Chromosomenabschnitts analysiert. Dabei wurden Primer, die innerhalb des Genbereichs von *pf*1950 bzw. *tk0914* liegen, mit Primern, die außerhalb der veränderten Region binden, kombiniert (Primer 5.2.6). Die durch wt *P. furiosus*-DNA und Mutanten-DNA erhaltenen Amplikons wurden mit den erwarteten Fragmentgrößen verglichen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass *pf*1950 im Genom von *P. furiosus* durch die Simvastatin-Resistenzkassette (*tk0914*) substituiert und der Stamm *P. furiosus* Δ XGPRT erzeugt wurde (vgl. Abb. 5.6).

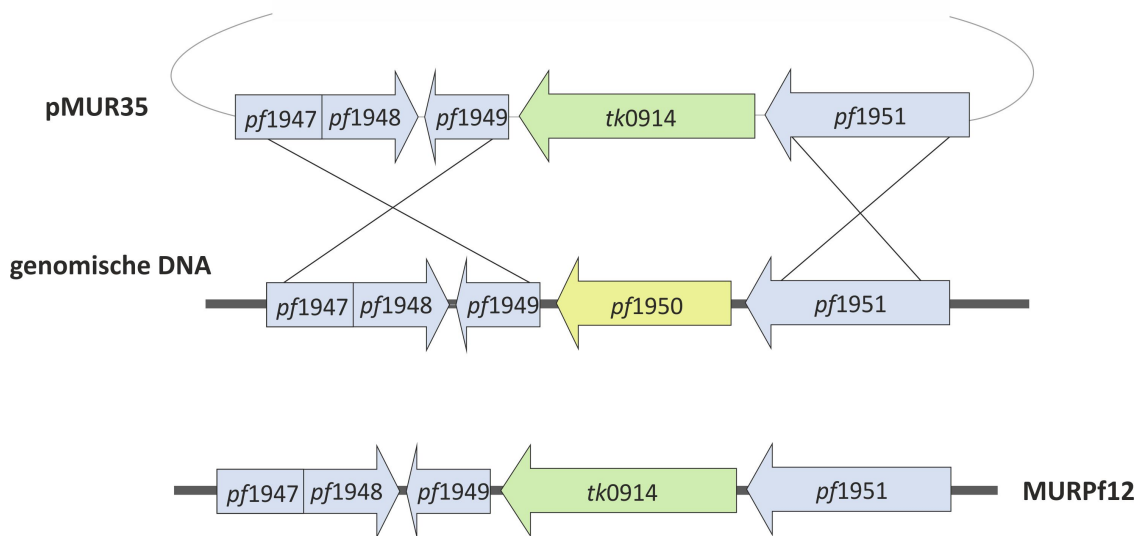


Abbildung 5.6.: Strategie zur Erzeugung von *P. furiosus* MURPf12. Das durch Überhang-PCR konstruierte Plasmid pMUR35 enthält zur homologen Rekombination die stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Sequenzen von *pf1950* (blau hinterlegte DNA-Bereiche) und das *tk0914*-Resistenzgen (grün hinterlegter Genbereich) zur Selektion mit Simvastatin. Durch Transformation und Selektion wurde der Stamm MURPf12 erzeugt, bei dem *pf1950* (gelb hinterlegter Genbereich) durch das *tk0914*-Resistenzgen substituiert wurde.

6-MP-Selektion. Die *P. furiosus* Δ XGPRT-Mutante und der Wildtyp wurden Wachstumsanalysen unterzogen. So wurde die hemmende Wirkung von 6-MP auf das Wachstum der Zellen charakterisiert und die Eignung des Agens zur Selektion der Transformanten in Flüssigmedium oder auf Gelrite-Platten überprüft. Wie erwartet, wird das Wachstum der Wildtypzellen durch den Zusatz von 6-MP stark inhibiert, die Δ XGPRT-Mutante hingegen ist innerhalb einer weiten Konzentrationsspanne resistent gegen 6-MP. Als optimale Selektionsbedingungen nach Transformationen von *P. furiosus* wurde 6-MP mit einer Konzentration von 1 mM bei einer Inkubationstemperatur von 80 °C ermittelt. Bei diesen Parametern wird das Wachstum des wt *P. furiosus* verlässlich für mindestens 48 Stunden gehemmt. Jedoch muss für eine effektive Selektion auf die Beigabe von Stärke als Substrat im verwendeten Flüssigkulturmedium verzichtet werden. Bei Kultivierung auf Gelrite-Vollmedium-Platten konnte im getesteten Konzentrationsbereich von 10 μ M bis 2 mM 6-Methylpurin keine signifikante Reduktion der Koloniezahl bei *P. furiosus* Δ XGPRT beobachtet werden, wohingegen das Wachstum von *P. furiosus* selbst bei geringsten 6-MP Konzentrationen effektiv gehemmt wurde. Da die *pf1950*-Deletionsmutante nur unwesentlich in ihrer Vitalität eingeschränkt schien und die Selektion der Mutanten mit 6-MP möglich ist, sollte nun *pf1950* als Markergen zur Etablierung der markerlosen Gegenselektions-Strategie bei *P. furiosus* eingesetzt werden. Hierfür sollte ein Stamm erzeugt werden, bei dem das Gen der *xgpRT* selbst markerlos deletiert wurde.

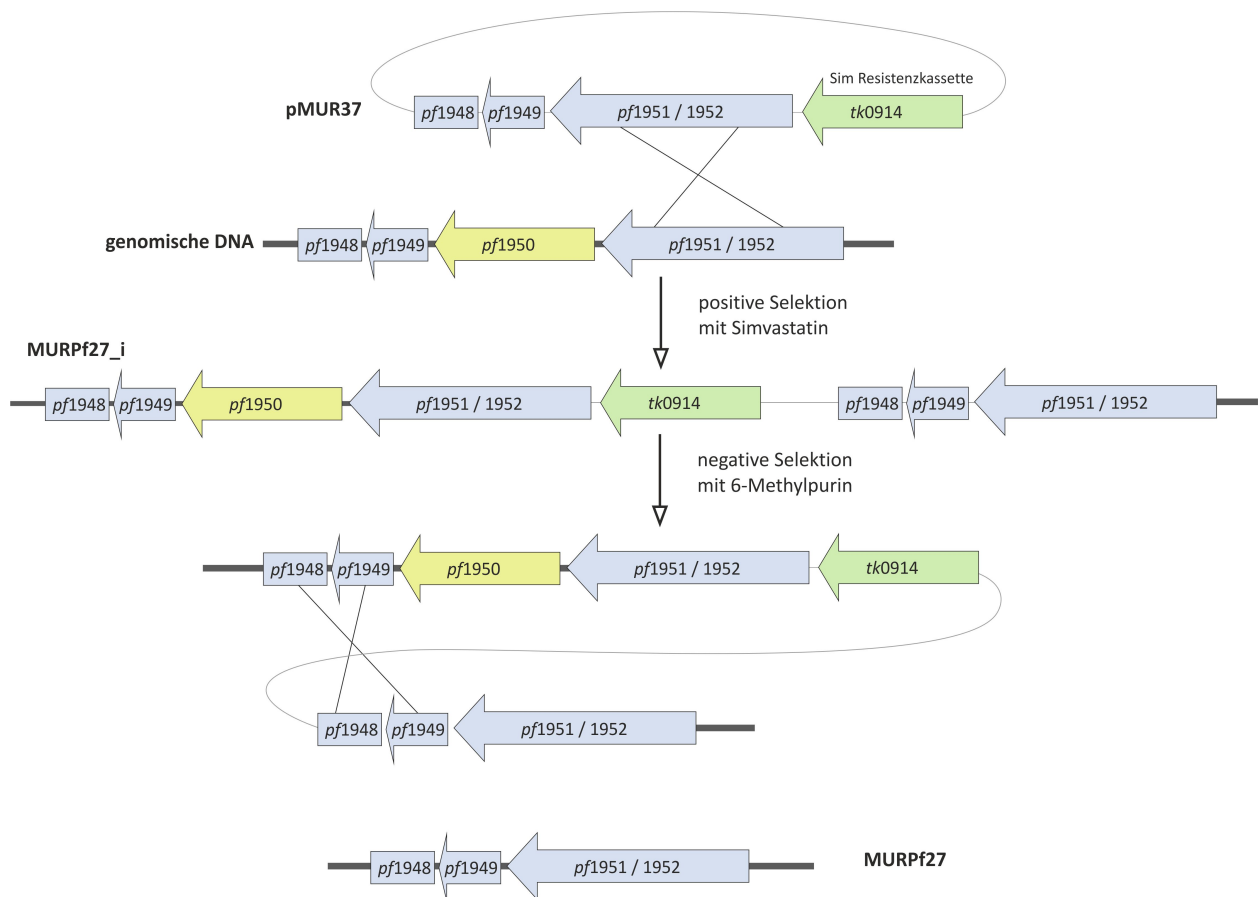


Abbildung 5.7.: **Strategie zur Erzeugung von *P. furiosus* MURPf27.** Das durch Überhang-PCR konstruierte Plasmid pMUR37 enthält zur homologen Rekombination die stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Sequenzen von *pf1950* (blau hinterlegte DNA-Bereiche) und die *tk0914*-Resistenzkassette (grün hinterlegter DNA-Abschnitt) zur Selektion mit Simvastatin. Die nach Transformation und Selektion erzeugte Zwischenmutante MURPf27_i wurde anschließend einer zusätzlichen negativen Selektion mit 6-MP unterzogen. Durch ein zweites Rekombinationsereignis wurde so der Stamm MURPf27 erzeugt, bei dem *pf1950* (gelb hinterlegter Genbereich) markarlos deletiert wurde. Abbildung modifiziert nach [Kreuzer *et al.*, 2013].

P. furiosus MLΔXGPRT - MURPf27

Um die markerlose Deletion von *pf1950* in *P. furiosus* zu erzeugen, wurde das Plasmid pMUR37 generiert [Schmutzler, 2011]. Der Aufbau des Vektors wurde so gewählt, dass sich dieser durch ein einfaches Crossing-Over-Ereignis komplett ins Genom integriert. Der Versuch, eine markerlose XGPRT-Deletionsmutante mit einem DNA-Konstrukt für ein doppeltes Crossing-Over-Ereignis zu erzeugen, konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. pMUR37 wurde zirkulär durch die beschriebene Hitzeschock-Prozedur in *P. furiosus* transformiert und die Zellen selektioniert. Nach Verifizierung der Zwischenmutante wurden die Zellen gegenselektioniert (vgl. Schema Abb. 5.7). In diesem Zusammenhang wurde offensichtlich, dass eine vollständige Entfernung aller Simvastatin-Bestandteile für eine erfolgreiche Gegenselektion essentiell ist. Daher wurden die Zellen der verifizierten Intermediär-Mutante mehrmals unter anaeroben Bedingungen mit Flüssigkulturmedium

ohne Simvastatin gewaschen, bevor sie auf den selektiven 6-MP-Platten vereinzelt wurden. Der Genotyp einer erzeugten Reinkultur wurde mittels isolierter genomischer DNA durch PCR (Oligonukleotide 5.2.6) und Southern Blot geklärt. Für diese wurde die DNA aus wt *P. furiosus* und MURPf27 einer Restriktionshydrolyse mit *Bst*XI unterzogen. Durch Digoxigenin-markierte DNA-Sonden gegen die Genbereiche von *pf*1950 und *tk*0914, sowie eine chromosomal stromaufwärts von *pf*1950 gelegene Sequenzregion wurde die Präsenz der jeweiligen Bereiche in den DNAs nachvollzogen. Zusätzlich wurde der korrekte Verlauf der Plasmid-Integration und -Entfernung durch PCR-Analysen und Sequenzierung der entsprechenden DNA-Fragmente nachvollzogen (Daten nicht gezeigt). So wurde nachgewiesen, dass *pf*1950 ohne Verbleib des zusätzlich verwendeten Selektionsmarkers aus dem Genom von *P. furiosus* entfernt wurde. Der Genotyp der erzeugten Mutante MURPf27 entspricht dem, durch das Plasmid pMUR37 geplanten Verlauf. Somit konnte eine Strategie zur markerlosen Deletion von Genbereichen für *P. furiosus* entworfen und etabliert werden. Die entstandene Mutante kann zukünftig als Ausgangsstamm für markerlose Deletionen, basierend auf den XGPRT- bzw. Simvastatin-Resistenzmarkern für die Selektion, genutzt werden. Dieses System wird im Folgenden bei der Erzeugung eines Chitinase-Fusionsproteins aus den Einheiten ChiA und ChiB in *P. furiosus* angewandt.

5.3.2. Modifikationen der Chitinase-Einheiten

P. furiosus ChiA Δ A1006-ML (MURPf23)

Durch Deletion eines Adenins an Position 1006 am Ende des Gens für die Chitinase-Einheit ChiA in *P. furiosus* sollte ein Frameshift erzeugt werden, durch den das Stopcodon in der katalytischen Domäne der ChiA-Einheit neutralisiert wird. Aus den beiden offenen Leserahmen von *pf*1234 (ChiA) und *pf*1233 (ChiB) würde somit ein Einzelner, der für ein Enzym homolog zur Chitinase aus *T. kodakarensis* (TK1765) kodiert. Der Vektor pMUR47 wurde zur Integration der Punktmutation durch ein doppeltes Crossing-Over-Ereignis geschaffen [Kreuzer *et al.*, 2013]. In diesem wurden die Sequenzen für ChiA (*pf*1234) und dem 5'-Bereich von ChiB (*pf*1233a) mit der Resistenzkassette sowie dem zweiten Teil der ChiB-Gensequenz (*pf*1233b) kombiniert. Wie in Abbildung 5.8 dargestellt, wird die Resistenzkassette für die Strategie zur markerlosen Manipulation durch das Selektions- und Gegenselektionsverfahren benötigt. Mittels PCR (Oligonukleotide 5.2.6) und Sequenzierung der isolierten DNA wurde der Genotyp des erzeugten Stammes *P. furiosus* ChiA Δ A1006-ML (MURPf23) untersucht und die markerlose Deletion der Base an Position 1006 bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Zusammensetzung des Chromosoms an der entsprechenden Region entspricht dem geplanten Konstrukt; alle Rekombinationsereignisse verliefen in den gewünschten Bereichen (vgl. Abb. 5.8). Die Deletion des Adenins sollte durch die entstehende Neutralisierung eines Stopcodons nun zur Produktion einer fusionierten ChiA-ChiB-Chitinase führen.

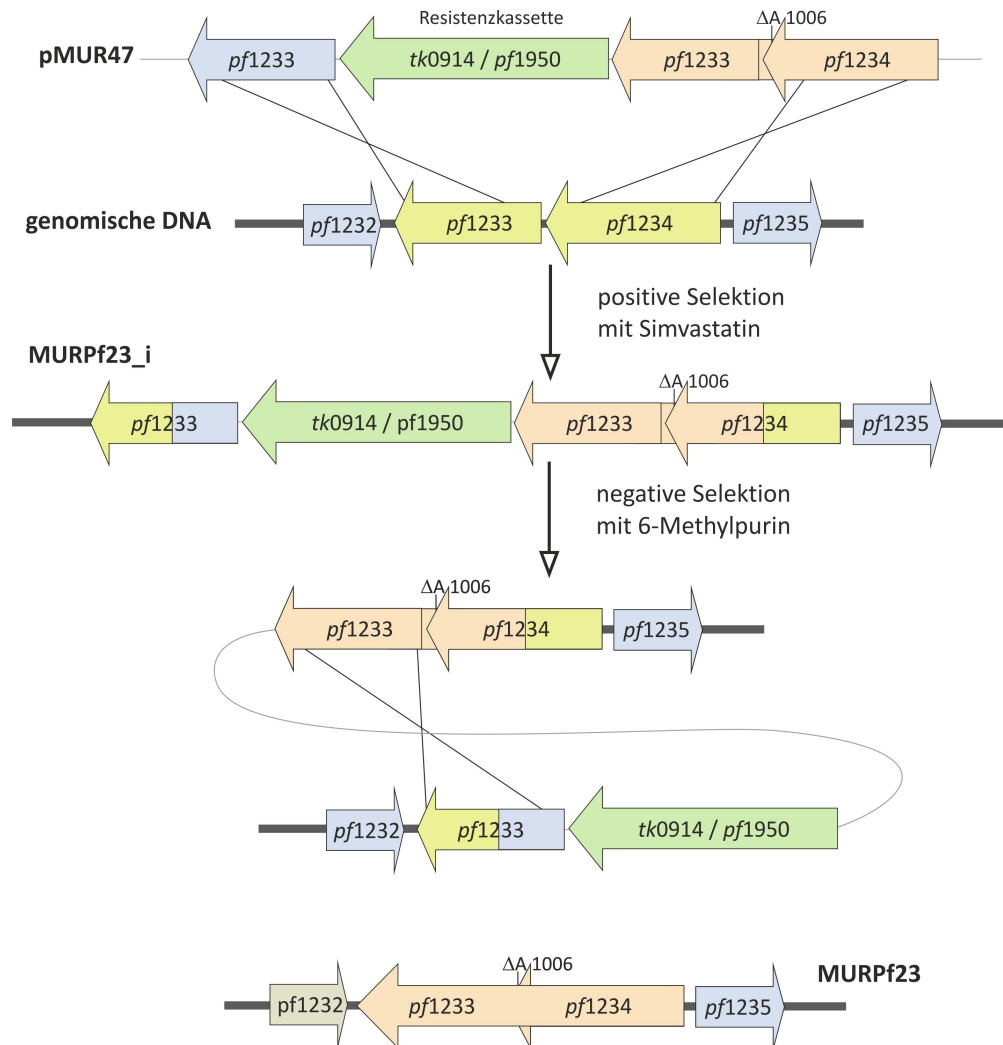


Abbildung 5.8.: **Strategie zur Erzeugung von *P. furiosus* MURPf23.** Das durch Überhang-PCR konstruierte Plasmid pMUR47 enthält die Chitinase-Sequenz mit der Deletion des Adenins an Position 1006 und, zur homologen Rekombination, die entsprechenden stromaufwärts- und stromabwärts flankierenden Sequenzen sowie die *tk0914/pf1950* Resistenzkassette (grün hinterlegter DNA-Abschnitt) zur Selektion mit Simvastatin und Gegenselektion mit 6-MP. Die nach Transformation mit linearisiertem pMUR47 und Selektion mit Simvastatin erzeugte Zwischenmutante MURPf23_i wurde anschließend einer zusätzlichen negativen Selektion mit 6-MP unterzogen. Durch ein zweites Rekombinationsereignis wurde so der Stamm MURPf23 erzeugt, bei dem die separierten Chitinase-Einheiten *pf1233* und *pf1234* (gelb hinterlegter Genbereich) durch ein fusioniertes Gesamtzym (rot hinterlegter DNA-Bereich) ersetzt wurde. Abbildung modifiziert nach [Kreuzer *et al.*, 2013].

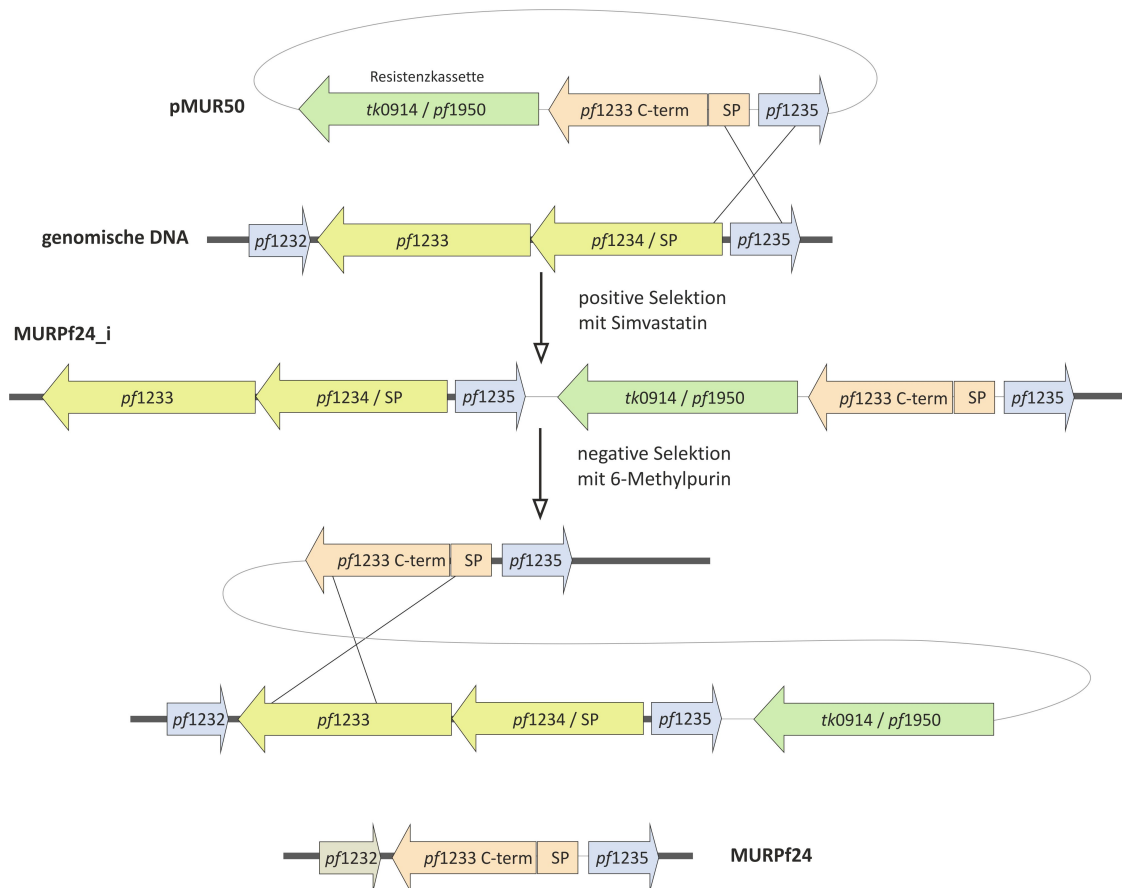


Abbildung 5.9.: **Strategie zur Erzeugung von *P. furiosus* MURPf24.** Das durch Überhang-PCR konstruierte Plasmid pMUR50 enthält eine modifizierte Chitinase-Einheit und, zur homologen Rekombination, die entsprechenden stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Sequenzen sowie die *tk0914/pf1950*-Resistenzkassette (grün hinterlegter DNA-Abschnitt) zur Selektion mit Simvastatin und Gegenselektion mit 6-MP. Die nach Transformation und Selektion mit Simvastatin erzeugte Zwischenmutante MURPf24_i wurde anschließend einer zusätzlichen negativen Selektion mit 6-MP unterzogen. Durch ein zweites Rekombinationsereignis wurde so der Stamm MURPf24 erzeugt, bei dem die separierten Chitinase-Einheiten *pf1233* und *pf1234* (gelb hinterlegter Genbereich) durch eine konstruierte Chitinaseversion (rot hinterlegter DNA-Bereich) ersetzt wurde. Abbildung modifiziert nach [Kreuzer *et al.*, 2013].

P. furiosus SP-ChiB (MURPf24)

Untersuchungen von Oku und Ishikawa (2006) deuten darauf hin, dass ein rekombinantes Enzym bestehend aus der ChBD und der katalytischen Domäne von ChiB, wesentlich höhere Aktivität gegenüber kristallinem Chitin aufweisen soll, als das Fusionsprotein aus ChiA-ChiB. Um diesen Befund *in vivo* bei *P. furiosus* nachvollziehen zu können, wurde zusätzlich ein Stamm erzeugt, bei dem die Produktion und Sekretion der entsprechenden ChiB-Einheit gewährleistet sein soll. Dazu wurde die putative Signalpeptidsequenz von ChiA vor den relevanten kodierenden Bereich von ChiB versetzt und dabei die Sequenzen von ChiA und der ersten Domäne von ChiB aus dem Genom entfernt [Kreuzer, 2011]. Es wurde ein Plasmid pMUR50 zur homologen Rekombination über ein einfaches Crossing-Over-Ereignis hergestellt, welches folglich zuerst komplett ins Genom integriert werden soll (vgl. Abb. 5.9). Auch in diesem Falle wurde zur Erstellung des Plasmids und der veränderten Chitinase-Einheit die im oberen Abschnitt bereits detailliert beschriebene

Resistenzkassette (*tk0914-pf1950*) verwendet. Für die Transformation in *P. furiosus* MLΔXGPRT (MURPf27) wurde pMUR50 zirkulär eingesetzt. Die Transformation sowie Selektion und Gegen-selektion erfolgten nach vorher beschriebener Prozedur. Durch PCR-Analyse (Oligonukleotide 5.2.6) und DNA-Sequenzierung der isolierten DNA wurde der Genotyp des erzeugten Stammes bestimmt. Im Chromosom des erzeugten Stammes *P. furiosus* SP-ChiB steht nun eine Expressi-onseinheit aus dem Signalpeptid von ChiA und der katalytischen Domäne von ChiB unter der Kontrolle des ChiA-Promotors. Das Signalpeptid sollte zur Sekretion der Einheit führen. Alle wei-teren Elemente der ChiA- und ChiB-Chitinase-Einheiten wurden aus dem Genom entfernt.

5.3.3. Untersuchungen des Chitin-Abbaus

Die Fähigkeit der erzeugten *P. furiosus*-Stämme Chitin abzubauen bzw. als Substrat zu nutzen wur-de bestimmt und mit den Ausgangsstämmen verglichen. Dazu wurden die Kulturen stufenweise an das veränderte Kulturmedium (0,5 % Chitin (kolloidal oder kristallin), 0,025 % Hefeextrakt, 0,025 % Pepton) adaptiert. Im Vergleich zum Chitin-freien Flüssigmedium, das für die Selektion nach den Transformationen verwendet wurde, ist für die Analyse der Chitin-Verwertung auch der Gehalt von weiteren Organika (Hefeextrakt und Pepton) stark reduziert.

Chitin-Umsetzung. Die Ansätze zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens wurden je zweimal in 500-ml-Druckflaschen mit je 200 ml Medium analog durchgeführt und für die Erstellung der Wachstumskurve die Mittelwerte der Zellzahlen berechnet. Dabei wurden die Kulturen je mit ei-ner Ausgangszelldichte von etwa $0,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml inokuliert und die Entwicklung der Zellzah-len bei 90 °C über 45 Stunden verfolgt und festgehalten. Wie in Abbildung 5.10 dargestellt liegt das Wachstum von ChiAΔA1006-ML (MURPf23) über dem des wt *P. furiosus* oder MLΔPF1950 (MURPf27)-Stammes, während MURPf24 mittlere Zelldichten erreicht. Bei den Wachstumsanaly-sen erreichte die Mutante ChiAΔA1006-ML (MURPf23) nach etwa 28 Stunden mit $1,0 \cdot 10^8$ Zel-len/ml die maximale Zelldichte. Die Zelldichte blieb danach auch in der stationären Phase über mindestens weitere 20 Stunden hinweg stabil. Im Gegensatz dazu erreichten *P. furiosus*-Wildtyp und der MLΔPF1950 (MURPf27)-Stamm nach 28-stündiger Inkubation nur $1,0 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Die fortgeführte Inkubation bewirkte einen Rückgang der Zellzahl. Die maximal erreichte Zelldichte des *P. furiosus*-Stammes mit der ChiB-Domäne (MURPf24) war im Vergleich zu MURPf23 mit dem fusionierten ChiA-ChiB Enzym auf $6,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml vermindert. Ferner wiesen die Zellen in der stationären Phase eine deutlich geringere Stabilität auf. Bei der mikroskopischen Begutachtung der Kulturen konnte festgestellt werden, dass ein Teil der Zellen an den Chitinpartikel festhef-tet. Daher muss von einer systematisch etwas zu niedrig bestimmten Zelldichte für die Kulturen ausgegangen werden. Die Berechnung der Zelldichten in den Kulturen erfolgte mittels Thoma-Zählkammer (0,02 mm Tiefe; Marienfeld, Lauda-Königshofen) und Phasenkontrast-Mikroskopie. Aufgrund der nur bedingten Löslichkeit des Chitins und der damit einhergehenden Trübung des Kulturmediums ist jedoch eine alternative Bestimmung der Zelldichte durch Ermittlung der opti-schen Dichte des Mediums nicht möglich.

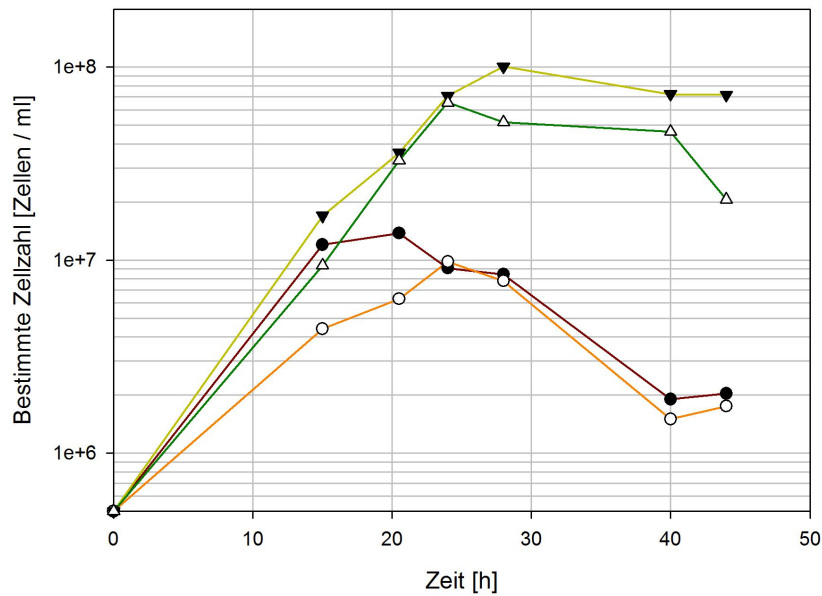


Abbildung 5.10.: Wachstumsverhalten von *P. furiosus* Wildtyp, MURPf27, MURPf23 und MURPf24 auf SME-Medium mit 0,5 % kolloidalem Chitin bei 90 °C. Wachstumskurven von wt *P. furiosus* (dunkel rot;●), *P. furiosus*MLΔPF1950 (MURPf27; orange; ○), *P. furiosus* ChiAΔA1006-ML (MURPf23; dunkelgrün;△) und *P. furiosus* SP-ChiB (MURPf24; hellgrün; ▼). Abbildung modifiziert nach [Kreuzer *et al.*, 2013].

ATP- und Acetat-Gehalt. Neben der Beobachtung der Zelldichten wurden zur weiteren Charakterisierung der Chitin-Umsetzung auch entstehende Stoffwechselprodukte und der 'Energiegehalt' der Kulturen analysiert. Bei *Pyrococcus* bietet sich dafür einerseits das energiereiche Nukleotid ATP, als auch das Hauptstoffwechselprodukt Acetat an. Da die Energiegewinnung der Zellen bei der Umsetzung von Pyruvat zu Acetat in Form von ATP stattfindet, steigt dessen Produktion mit dem Wachstum der Kulturen an. Zwar existieren in den Zellen noch weitere Möglichkeiten zur Energiegewinnung durch die Bildung von ATP, diese sind jedoch in den verschiedenen *P. furiosus*-Stämmen analog vorhanden (siehe: Karolin Schmutzler [Schmutzler, 2011]). Die Menge an Acetat im Überstand der Kulturmedien wurde, wie unter 5.2.4 beschrieben, aus 0,5 ml *Pyrococcus*-Kultur durch einen Test-Kit zur enzymatischen Bestimmung des Acetat-Gehalts (R-biopharm, Darmstadt) analysiert. Die Quantifizierung der ATP-Menge in den *P. furiosus*-Zellen erfolgte durch einen Luciferin-Luciferase-Assay an einem Luminometer. In Abbildung 5.11 sind die ermittelten ATP- und Acetat-Werte von wt *P. furiosus* sowie MURPf23 und MURPf27 auf dem oben beschriebenen Medium mit 0,5% kolloidalem Chitin dargestellt. Die Bestimmung der Acetat-Konzentrationen (nach etwa 55 Stunden Inkubation) ergab einen starken Anstieg auf bis zu 18 mM Acetat im Kulturmedium der ChiAΔA1006-ML-Mutante. Die Kontrollstämme wt *P. furiosus* und MLΔPF1950 hingegen wiesen Acetat-Konzentrationen unter 1 mM auf. Die Quantifizierung der ATP-Level der Kulturen ergab bei MURPf23 eine um das zehnfache gesteigerte ATP-Konzentration auf. Dies erneut im Vergleich zum Wildtyp und dem *P. furiosus*-Ausgangsstamm, was exakt den Faktor im Unterschied der maximal erreichten Zelldichten widerspiegelt. Die großen Unterschiede der gemessenen Acetat-Konzentrationen der Kulturen bekräftigen die Annahme,

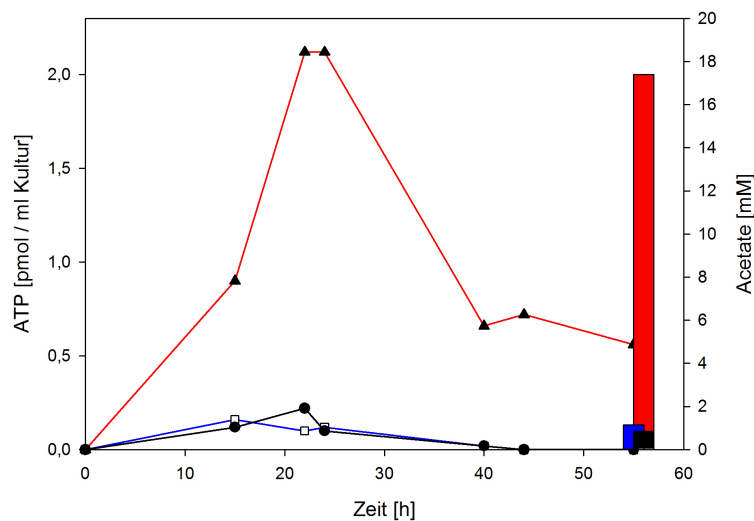


Abbildung 5.11.: **ATP- und Acetat-Gehalt.** Wachstumsanalyse der *Pyrococcus*-Stämme durch Quantifizierung des ATP-Gehalts (linke Achse) und der Acetat-Endkonzentration nach 55 Stunden (rechte Achse). wt *P. furiosus* (blau; □), *P. furiosus* MLΔPF1950 (MURPf27; schwarz; ●) und *P. furiosus* ChiAΔA1006-ML (MURPf23; rot; ▲). Abbildung modifiziert nach [Kreuzer *et al.*, 2013].

dass die *P. furiosus*-Stämme mit den modifizierten Chitinase-Enzymen Chitin als Kohlenstoffquelle nutzen können. Da Chitin in hohem Maße acetyliert ist wird angenommen, dass bei der Umsetzung des Chitins das Acetat frei gesetzt wird und daher die Steigerung der Acetat-Konzentration während des Wachstums der *Pyrococcus*-Mutanten ein Beleg für deren Fähigkeit ist, Chitin zu verwerten. Allein durch die visuelle Begutachtung der bewachsenen Kulturen konnten bereits Eindrücke über die Chitin-Verwertung der Stämme gewonnen werden. Während die Flüssigkulturmedien bei wt *P. furiosus* und MLΔPF1950 (MURPf27) selbst nach einer Inkubationszeit von 55 Stunden durch die unlöslichen Chitin-Bestandteile noch deutlich getrübt waren, konnte durch die Klärung bei den Flüssigkulturmedien von MURPf23 und MURPf24 der Abbau des Chitins beobachtet werden.

Somit konnte die Hypothese bekräftigt werden, dass durch die Neutralisierung eines Stopcodons in der Chitinase-Einheit ChiA eine Chitinase gebildet wird, deren Aktivität über jener der wt Einheiten liegt. Die erzeugte Mutante ChiAΔA1006-ML (MURPf23) weist bei Wachstum auf dem Substrat Chitin deutlich höhere Zellzahlen auf als der Wildtyp, oder der Ausgangsstamm MURPf27. Wird dabei wie vermutet eine Chitinase ChiA-ChiB vergleichbar zu *T. kodakarensis* produziert und sezerniert, könnte dies auf eine konzertierte Aktivität von ChiA und ChiB (im fusionierten Enzym) beim Abbau der verschiedenen Chintypen schließen lassen. Bezüglich der Expression der ChiB-Einheit mit Signalpeptid bei MURPf24 konnte im Vergleich zum Ausgangsstamm MLΔPF1950 (MURPf27) eine Steigerung der Wachstumsrate mit kristallinem Chitin als Substrat verzeichnet werden. Dies würde bestätigen, dass das rekombinante Enzym in der Lage ist, kristallines Chitin abzubauen. Jedoch lagen die ermittelten Zelldichten von MURPf24 deutlich unter denen von MURPf27.

5.4. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, die Funktionalität der Chitinasen von *P. furiosus in vivo* genauer zu analysieren und zu ermitteln, ob tatsächlich durch die Insertion einer Base der Metabolismus von Chitin verhindert wird. Es wurde daher, basierend auf den bereits für *P. furiosus* existierenden genetischen Hilfsmitteln, eine Methodik zur markerlosen Manipulation des Organismus entwickelt. Durch eine Basendeletion im Sequenzbereich der ChiA- und ChiB- Chitinase-Einheiten wurde die hypothetische Verschiebung des Leserasters des Chitinasegens behoben. Dadurch entstand ein Genbereich, der für eine fusionierte Chitinase kodiert, welche eine, im Vergleich zu den ChiA- und ChiB-Einheiten höhere Sequenzidentität zur homologen Chitinase bei *T. kodakarensis* aufweist. Zur Untersuchung der Aktivität des Teilenzyms ChiB gegenüber kristallinem Chitin *in vivo* wurde eine weitere Mutante erstellt. Die Sequenz von ChiB (bestehend aus einer katalytischen sowie einer Chitinbindedomäne) wurde an das Signalpeptid von ChiA fusioniert und dabei die restlichen Genbereiche der ChiA- und ChiB-Einheiten deletiert.

MURPf23 Der Ausgangsstamm *P. furiosus* MLΔPF1950 wurde verwendet, um das zusätzliche Nukleotid an Position 1006 in der Gensequenz von *pf1234* zu entfernen um dadurch eine fusionierte Chitinase aus den ChiA- und ChiB-Einheiten zu bilden. Durch genaue Analyse des Wachstumsverhaltens und der Stoffwechselraten anhand von ATP- und Acetat-Produktion konnte bei den wt *P. furiosus*- und Mutanten-Stämmen die Fähigkeit, Chitin abzubauen, nachvollzogen werden. Die Stämme mit den modifizierten Chitinase Enzymen scheinen dabei einen signifikanten Vorteil beim Wachstum auf Chitin zu besitzen. Die Wachstumsraten von MURPf23 lagen deutlich über denen des Wildtyps und der zusätzlichen *P. furiosus* MLΔPF1950 Kontrolle (vgl. Abb. 5.10). Wachstumsanalysen des, für die markerlose Manipulationen verwendeten Ausgangsstammes MLΔPF1950 (MURPf27) zeigten jedoch bei nicht ganz optimalen Wachstumsbedingungen eine verminderte Vitalität. Trotz Zugabe von IMP+GMP konnte MURPf27 nicht die Wachstumsraten aufweisen, die beim wt *P. furiosus* analysiert wurden. Auch bei wt *P. furiosus* konnte in geringem Maß der Abbau von kolloidalem Chitin beobachtet werden (vgl. Abb. 5.10). Daher kann von einer reduzierten Rest-Aktivität der verkürzten ChiA-Einheit ausgegangen werden. Die Untersuchungen eines rekombinanten ChiA-Enzyms ergaben eine Aktivität von 0,035 U/mg gegenüber kolloidalem Chitin [Gao *et al.*, 2003]. Als Vergleich dazu wurde für die membrangebundene Chitinase von *T. chitonophagus* eine Aktivität von 3 U/mg gemessen [Andronopoulou und Vorgias, 2003]. Die noch erhaltene schwache Aktivität des Enzyms könnte zum beobachteten geringen Wachstum des wt *P. furiosus*-Stammes beitragen. Demnach erscheint es unwahrscheinlich, dass *P. furiosus* unter nativen Bedingungen allein durch die Verwertung von Chitin als Hauptkohlenstoffquelle wachsen kann. Durch eine Baseninsertion wird ein Stopcodon im Genbereich der katalytischen Domäne von ChiA gebildet, das die Chitinase in zwei Leserahmen teilt. Dies sollte die Produktion eines funktionellen Gesamtzyms im Wildtypstamm weitestgehend verhindern. Durch die Fusionierung der beiden Chitinasen-Einheiten bzw. die Entfernung des zusätzlichen Adenins an Position 1006 bei der Mutante ChiAΔA1006-ML (MURPf23) wurden die Zelldichten des Stammes auf kolloidalem Chitin im Vergleich zum Ausgangsstamm um mehr als ein vierfaches gesteigert.

Obwohl der Wildtyp schwach auf dem Substrat wächst, wird durch die Korrektur des Gendefekts der Chitinase die Effektivität der Chitinverwertung deutlich verbessert. Durch die Analyse der Chitinase-Gensequenzen bei *P. furiosus*, besonders im Bereich der Baseninsertion, konnte die Vermutung von Oku und Ishikawa (2006) bestätigt werden. Durch eine Nukleotidinsertion an Position 1006 bei *pf1234* wird eine Verschiebung des Leserasters verursacht, welche zur Entstehung eines Stopcodons nach einer Länge von zehn Aminosäuren führt. Das zweite Chitinase-Gen *pf1233* beginnt 37 Basenpaare stromabwärts von *pf1234*. RT-PCR-Experimente deuten darauf hin, dass beide Gene, sowohl bei Wachstum der Zellen auf Chitin-haltigem Medium als auch bei Medium ohne Chitin, separat transkribiert werden [Gao *et al.*, 2003]. Jedoch konnte stromaufwärts von *pf1233* kein Promotorsignal identifiziert werden. Weiterhin wird auch durch den Vergleich der Sequenzen der Chitinase-Einheiten mit dem entsprechenden Genlokus der Chitinase von *T. kodakarensis* deutlich, dass durch die Entfernung eines Adenins an Position 1006 eine viel höhere Übereinstimmung der Sequenzen in diesem Bereich erhalten wird (vgl. Abb. 5.1).

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der Chitinasen aus *P. furiosus* und *T. kodakarensis* kann davon ausgegangen werden, dass sich die Mutation bei *P. furiosus* in jüngerer Vergangenheit ereignet hat und auch ein gewisser Selektionsdruck in Richtung eines aktiven Enzyms, eventuell durch +/-1 Verschiebung des Leserasters, besteht [Cobucci-Ponzano und Moracci, 2012]. Dabei besteht die Möglichkeit, dass *P. furiosus* in der Lage ist, durch einen vorgegebenen ribosomalen +/-1 Leserastersprung die Verschiebung des Leserasters zu umgehen. Dieser Fall wurde kürzlich für das Archaeum *S. acidocaldarius* beschrieben. Jedoch liegt hier die Expressionseffizienz im Vergleich zu einem Gen ohne vorgegebene ribosomalen +/-1 Leserasterverschiebung bei nur 5 % [Cobucci-Ponzano *et al.*, 2012]. Dieser Mechanismus gäbe eine weitere mögliche Erklärung für die begrenzten Wachstumsraten des wt *P. furiosus*-Stammes auf Chitin. Um sicherzustellen, dass dies tatsächlich auch auf die Chitinase von *P. furiosus* zutrifft, sind weitere Tests notwendig.

Erste Versuche die Chitinase aus *P. furiosus* für eine massenspektrometrische Charakterisierung zu reinigen konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden, da das Enzym offensichtlich durch intensiven proteolytischen Abbau degradiert wird (Daten nicht gezeigt). So wurde im Kulturüberstand von *T. kodakarensis* eine Chitinase der Masse 134 kDa erwartet, aber nur Proteine mit 70 kDa und 35 bis 40 kDa konnten der Chitinase zugeordnet werden. Für die fusionierte Chitinase von MURPf23 wurde eine Masse von 124 kDa und bei der verkürzten ChiB-Einheit des Enzyms bei MURPf24 50 kDa errechnet. Jedoch zeigte ein Vergleich des Proteingehalts im Kulturmedium von MURPf23, MURPf24 und *P. furiosus*-Wildtyp (Chitinase 35 kDa) keine Unterschiede im Proteinhalt. Die Enzyme werden anscheinend sowohl bei *P. furiosus* als auch bei *T. kodakarensis* im Medium prozessiert. Daher können nur kleine Fragmente nachgewiesen werden. Eine derartige posttranslationale Prozessierung wurde bereits für bakterielle Chitinasen beschrieben [Gal *et al.*, 1998, Gleave *et al.*, 1995]. Bei bakteriellen Chitinasen aus verschiedenen Organismen wurde eine spezifische proteolytische Spaltung eines Vorläuferenzym in kleinere aktive Isoformen beschrieben. Die Enzyme besitzen danach teils unterschiedliche Aktivitäten gegenüber den einzelnen Chitinarten. Meist wird die Chitinbindedomäne abgespalten, wodurch die Aktivität gegenüber kristallinem Substrat abnimmt. Die kleineren prozessierten Isoformen können jedoch kolloidales Chitin, sowie lösliche Chitooligomere effizient hydrolysieren [Gal *et al.*, 1998, Gleave *et al.*, 1995].

MURPf24 Eine weitere Mutante (MURPf24) mit einer reduzierten Chitinase-Einheit, bestehend aus einer ChBD und einer katalytischen Domäne, erzielte bei den Wachstumsanalysen mittlere Wachstumsraten. Wird nur ein ChiB-Teilenzym produziert (*P. furiosus* SP-ChiB), ist das Wachstumsvermögen auf kolloidalem Chitinmedium unverändert. Jedoch scheint der Abbau von kristallinem Chitin mit diesem Enzym effektiver zu sein. Im Vergleich zum Ausgangsstamm sind die Zelldichten bei MURPf24 mehr als doppelt so hoch. Allerdings sind auch auf diesem Substrat die Zellzahlen der Mutante MURPf23 deutlich höher, was auf eine Steigerung der Effektivität der Chitinverwertung durch synergistische Aktivität der Enzyme im Organismus hindeutet. Die Ergebnisse bestätigen, dass ChiB unabhängig von ChiA den Abbau von kristallinem Chitin katalysieren kann, was bereits durch *in vitro* Versuche mit rekombinanten Einheiten gezeigt wurde [Oku und Ishikawa, 2006]. Oku und Ishikawa (2006) hatten Hinweise darauf gefunden, dass eine rekombinante verkürzte Version der Chitinase, bestehend aus der ChBD und der katalytischen B-Domäne, eine höhere Aktivität aufweist, als das Chitinasevolllängenenzym. Um zu untersuchen, ob dieser *in vitro* Befund auch *in vivo* bestätigt werden kann, wurde die Mutante MURPf24 erstellt. Jedoch belegen die generierten Daten eindeutig, dass der *P. furiosus*-Stamm mit der korrigierten Gesamt-Chitinase (MURPf23), anstatt der zwei getrennten Chitinase-Einheiten des Wildtyps, gegenüber dem Stamm mit der verkürzten ChiB-Version, MURPf24, einen Vorteil bezüglich des Wachstums auf dem Substrat Chitin aufweist. Daher konnten die *in vitro* generierten Befunde von Oku und Ishikawa (2006) in diesem Fall *in vivo* nicht bestätigt werden.

Fazit. Durch eine einzelne Basendeletion konnte bei *P. furiosus* die in zwei getrennten Leserastern vorliegende Chitinase zu einer kodierenden Sequenz fusioniert werden. Die dadurch produzierte Chitinase steigert den Abbau und die Verwertbarkeit von Chitin durch *P. furiosus* signifikant. Zugleich weist das erzeugte Enzym starke Homologien zur Chitinase von *T. kodakrensis* auf. Die Ergebnisse legen nahe, dass bei *P. furiosus* das Gen der Chitinase ursprünglich als eine durchgängige Basensequenz vorlag und erst vor jüngerer Zeit durch die Insertion einer Base zu zwei getrennten Chitinase-Einheiten führte.

6. Allgemeine Diskussion

Im Laufe der letzten Jahre wurden große Fortschritte bei der Entwicklung und Etablierung von Strategien zur genetischen Manipulation von Archaeen, besonders der *Thermococcales* erzielt. Für *P. furiosus* stehen heute genetische Hilfsmittel zur Antibiotika-vermittelten und markerlosen chromosomalen Veränderung zur Verfügung. Die zurzeit verfügbaren genetischen Techniken erlauben sowohl die chromosomale Deletion und Modifikation von nicht-essentiellen Genen als auch die Produktion von zusätzlichen Proteinen via Shuttle-Expressionsvektoren. Während bei der Verwendung des Simvastatin-Selektionsmarkers zur positiven Selektion eine subsequeunte Modifikation des Stammes mit dem identischen Marker nicht möglich ist, können durch die markerlose Selektion-Gegenselektionsstrategie Stämme mit einer Vielzahl von unabhängigen Gendeletionen generiert werden. Damit können bei ein und demselben Stamm die gleichen Resistenzmarker verwendet werden, um nacheinander verschiedene Modifikationen im Genom zu erzeugen. Die Kombination von verschiedenen Selektionsverfahren und -markern sowie Rekombinationsstrategien sollte damit in Zukunft auch komplexe genetische Manipulationen bei *P. furiosus* ermöglichen.

Transformationsfrequenz Vor einiger Zeit wurde ein *P. furiosus*-Stamm beschrieben, für den eine stark erhöhte Transformationseffizienz charakteristisch ist [Lipscomb *et al.*, 2011]. Da dessen Genotyp jedoch an insgesamt 122 Genloci [Bridger *et al.*, 2012] zu dem, für diese Studien verwendeten *P. furiosus*-Stamm (DSMZ3638) abweicht, können Vergleiche nur eingeschränkt und unter Vorbehalt gezogen werden. Durch die Unterbrechung von 122 kodierenden Sequenzen und der damit einhergehenden Beeinflussung der entsprechenden Proteinaktivitäten ergeben sich eine Vielzahl undefinierter Effekte und Veränderungen im Stoffwechsel der Zellen. Obwohl die Faktoren, welche die erhöhte Transformationsfrequenz bei dem Stamm verursachen, noch ungeklärt sind, wird vermutet, dass der bei *P. furiosus* DSMZ 3638 Wildtyp vorhandene Mechanismus der natürlichen Kompetenz bei diesem Stamm durch die Veränderungen verstärkt ist [Lipscomb *et al.*, 2011]. Jedoch sind weder Komponenten und Mechanismus der DNA-Aufnahme in die Zelle noch der Mechanismus der DNA-Rekombination bei *P. furiosus* identifiziert oder charakterisiert. Die Transformationsrate für lineare DNA-Fragmente mit 1000 bp langen homologen Sequenzen lag bei diesem Stamm bei 10^5 Transformanten pro μg DNA [Lipscomb *et al.*, 2011], was eine Transformationsfrequenz von 10^{-3} ergibt. Entsprechende Ansätze bei *T. kodakarensis* ergaben weniger als 100 Transformanten pro μg DNA [Sato *et al.*, 2005] und damit nur eine Transformationsfrequenz von 10^{-7} . Die für *P. furiosus* bestimmte Transformationseffizienz mit dem Shuttle-Vektor pYS3 lag bei $5 \cdot 10^2$ Transformanten pro μg Plasmid-DNA [Waage *et al.*, 2010]; eine Untersuchung der Frequenz bei der Transformation von linearen DNA-Fragmenten wurde jedoch nicht vorgenommen.

Rekombinationshäufigkeit Obwohl es noch keinerlei Studien über die Rekombinationseffizienz in *P. furiosus* gibt, zeigt eine Untersuchung der DNA-Reparaturfähigkeit des Organismus, dass dieser ein durch Gamma-Strahlung vollständig fragmentiertes Chromosom religieren kann [DiRuggiero *et al.*, 1997]. Daher kann von einem sehr effizienten Rekombinationsmechanismus ausgegangen werden. *P. furiosus* und *T. kodakarensis* können beide mittels linearer DNA-Fragmente transformiert werden, jedoch ist die Länge der homologen Sequenz, welche für die Rekombination benötigt wird, unterschiedlich. Während bei *P. furiosus* bisher nur homologe Bereiche mit einer Länge von etwa 500-1000 bp getestet wurden, ist bei *T. kodakarensis* eine Länge von 100 bp als für eine Rekombination ausreichend beschrieben [Sato *et al.*, 2005]. Bei dem hoch kompetenten *P. furiosus*-Stamm verliefen Rekombinationen mit 40 bp langen homologen Bereichen erfolgreich [Farkas *et al.*, 2012]; für die Transformation von *S. solfataricus* sind sogar 10 bis 30 bp für eine homologe Rekombination ausreichend [Kurosawa und Grogan, 2005]. Aufgrund der gesteigerten Rekombinationsfrequenz werden jedoch meist homologe Sequenzbereiche mit einer Länge deutlich über 200 bp gewählt.

Im Folgenden wird nun ein Blick auf die Vor- und Nachteile geworfen, die sich bei den beschriebenen Techniken und Strategien ergeben. Besonders im Fokus stehen dabei Nutzen und Einsatzmöglichkeiten von Shuttle-Vektoren sowie dem Antibiotikum Simvastatin als positives Selektionsmittel und die Herausforderungen der markerlosen Manipulationsstrategie. Des Weiteren werden die in jüngster Zeit durchgeführten Studien neuer Selektionsstrategien bei *P. furiosus* dargestellt.

6.1. Erfahrungsberichte - Grenzen und Möglichkeiten der genetischen Hilfsmittel

6.1.1. Der Expressionsvektor

Obwohl *P. furiosus* nativ keine extrachromosomalen Elemente enthält, konnte gezeigt werden, dass Plasmide aus anderen *Thermococcales* stabil repliziert werden können [Waage *et al.*, 2010]. Der Shuttle-Vektor pYS2 wurde durch Fusion von pGT5 aus *P. abyssi* und pLitmus38 (einem pUC18-Derivat) aus *E. coli* konstruiert, um einen potentiellen Shuttle-Vektor zwischen *E. coli* und *P. abyssi* [Lucas *et al.*, 2002] zu generieren. Durch die Integration des Simvastatin-Resistenzmarkers konnte der Vektor so modifiziert werden, dass er auch für Transformationen in wt *P. furiosus* eingesetzt werden kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob es in Zukunft möglich ist, durch die Etablierung weiterer Selektionsstrategien bei *P. furiosus* die Ausstattung an Markergensequenzen der pYS-Shuttle-Vektoren zu erweitern, so, wie dies bei *T. kodakarensis* [Santangelo *et al.*, 2010] möglich war. In den pYS-Shuttle-Vektoren sind die notwendigen Sequenzen integriert, um sowohl die Selektion als auch die stabile Replikation des Plasmids in beiden Organismen in nährstoffreichem Medium zu gewährleisten. Jedoch ist die Kopienanzahl der pYS-Shuttle-Vektoren in *P. furiosus* im Vergleich zur derjenigen von pYS2 in *P. abyssi* stark reduziert. Während pYS2 wie auch pGT5 in *P. abyssi* mit etwa 20-30 Kopien pro Chromosom vorliegt [Lucas *et al.*, 2002, Erauso *et al.*, 1996], wurden bei pYS3 in *P. furiosus* lediglich 1-2 Kopien pro Chromosom nachgewiesen [Waage *et al.*,

2010]. Die Ursache hierfür konnte bisher nicht geklärt werden. Da jedoch aus pGT5-abstammende Shuttle-Vektoren nicht stabil in *T. kodakarensis* [Santangelo *et al.*, 2010, Leigh *et al.*, 2011] repliziert werden können, könnten artspezifische Komponenten der Replikationsmechanismen für die geringe Kopienzahl verantwortlich sein. Der stabile Verbleib der Shuttle-Vektoren wurde bei *P. furiosus* mit Wachstumsreihen untersucht. Jedoch kann keine Aussage über den Einfluss von Langzeit-Kultivierungen, Cryo-Lagerung oder der Art des inserierten Fragments auf die Stabilität gemacht werden.

Proteinexpression. Die rekombinante Produktion von hyperthermophilen Proteinen in Wirtsorganismen kann durch das Fehlen von benötigten Chaperonen, Co-Faktoren, Metallen oder post-translationalen Modifikationen limitiert werden. Gleichfalls können die produzierten Proteine toxisch auf den Wirtstamm wirken, wenn sie Komponenten des Zellstoffwechsels des Wirts stören. Die Verwendung eines hyperthermophilen Wirtes kann die Produktion von thermophilen Proteinen erleichtern oder sogar essentiell sein, wenn zur Proteinreifung archaeele Komponenten benötigt werden. Für die Produktion und Funktionsanalyse von archaeeilen Membranproteinen wird zudem vermutet, dass eine Produktion in Archaeen unumgänglich ist, da die archaeele Lipid-Umgebung der Membranproteine vorhanden sein muss [Matsuno *et al.*, 2009]. Bei Bedarf können auch exogene Proteine unter den Kultivierungsbedingungen der *Thermococcales* produziert werden, wie durch Verwendung von *T. kodakarensis* als Wirt demonstriert wurde [Santangelo *et al.*, 2010, Takemasa *et al.*, 2011]. Gerade dies könnte zukünftig neue Anwendungsmöglichkeiten von *P. furiosus* für eine biotechnologische bzw. industrielle Nutzung zur Produktion von thermostabilen Proteinen schaffen [Littlechild *et al.*, 2013, Littlechild, 2011].

Proteinmodifikation. Ein weiterer Vorteil des Shuttle-Vektor-Systems ist, dass die Sequenzen der zu produzierenden Proteine schnell und unkompliziert verändert werden können. Wie am Beispiel der RpoA"-RNAP-Mutanten (vgl. Kapitel 2) beschrieben, kann eine im Vektor inserierte Sequenz, etwa über ortsspezifische Mutagenese leicht modifiziert werden, um so Proteintags anzufügen oder verschiedene gezielt, oder wahllos mutierte Proteinversionen zu erzeugen. Im Fall der modifizierten RpoA"-Untereinheiten bei *P. furiosus* (vgl. Kapitel 2) wurde gezeigt, dass das Shuttle-Vektor-System nicht nur die regulierbare Produktion von endogenen Proteinen ermöglicht, sondern selbst defekte Versionen von essentiellen Proteinen in *P. furiosus* produziert werden können. Durch die simultane Anwesenheit des wildtyp Proteins werden alle zellulären Funktionen aufrecht erhalten, um die Vitalität der *P. furiosus*-Zellen zu gewährleisten. Es wurde gezeigt, dass selbst bei der Produktion der modifizierten RpoA"-Untereinheiten, welche zu inaktiven RNAP-Komplexen führen sollten, die *P. furiosus*-Zellen lebensfähig sind.

Proteintags. Wie gleichfalls im Kapitel 2 dargestellt, kann die Reinigung der produzierten Proteine, wie den RNAP-Untereinheiten durch die Addition von Protein-Tags vereinfacht werden. Vor allem Hexahistidin-Tags haben sich dabei bewährt. Bildet das produzierte Fusionsprotein in *P. furiosus in vivo* Komplexe, können mit dieser Methode über Affinität des His-tags zu zweiwertigen Metallionen die assemblierten Proteinkomplexe aus dem *P. furiosus*-Zelllysats chromatographisch

isoliert werden. Für bisher noch wenig charakterisierte Protein-Wechselwirkungen könnten so über die massenspektrometrischen Untersuchungen der isolierten Komplexe neue Interaktionspartner und Proteinfunktionen identifiziert werden. Dieses Verfahren wurde bereits bei *T. kodakarensis* erfolgreich angewendet [Dev *et al.*, 2010]. Schließlich eröffnen sich auch durch Untersuchungen der zellulären Veränderungen, welche durch die Produktion von Proteinmutanten induziert werden, neue Möglichkeiten, Rückschlüsse auf Stoffwechselwege und Regulationsmechanismen zu ziehen. Bei bekannten Proteinkomplexen, wie im Fall der RNAP, kann das System angewendet werden, um effizient Struktur-Funktions-Analysen von verschiedenen Proteinvarianten durchführen zu können. Durch ortsspezifische Mutagenesen der getaggtten Proteinsequenz kann nahezu jede beliebige Veränderung in die Aminosäuresequenz eingeführt werden. Nach Produktion in *P. furiosus* können die modifizierten Proteine, oder entsprechend die an das getaggte Protein assemblierten Proteinkomplexe aus dem Zelllysats isoliert und die Auswirkung der Veränderung auf die Funktionalität des Proteins bzw. des Komplexes getestet werden. Durch diese Methode war es möglich, Varianten der RNAP von *P. furiosus* mit Modifizierungen in einem für die Aktivität der RNAP essentiellen Bereich zu erzeugen. Mutierte und getaggte RpoA"-Untereinheiten wurden so in *P. furiosus* produziert und konnten zur Reinigung der assemblierten RNAPs verwendet werden. Demnach vereinfacht diese Prozedur die Bereitstellung von modifizierten RNAPs, da die Untereinheiten nicht mehr, wie vorher üblich, einzeln in *E. coli* produziert und anschließend durch *in vitro* Rekonstitution zu Enzymkomplexen vereinigt werden müssen [Naji *et al.*, 2007].

Regulation des Expressionsniveaus. Die Möglichkeit, das Expressionsniveau der defekten Proteine über die Wahl der Promotorsequenz zu steuern, ist von Vorteil. Hierbei stehen bislang nur wenige Promotoren zur Verfügung, deren Regulation charakterisiert ist. Zudem kann deren Aktivität nur bedingt gesteuert werden. Durch die Verwendung des Promotors der FB Pase wird die Produktion unter gluconeogenetischen Bedingungen effizient gesteigert. Bei *T. kodakarensis* ist für den entsprechenden Promotor des Gens *tk2164* ein 15-facher Anstieg des Expressionsniveaus bei gluconeogenetischem Wachstum dokumentiert [Hirata *et al.*, 2008a] und auch bei *P. furiosus* konnte eine deutliche Steigerung der Expressionsrate nachgewiesen werden [Waage *et al.*, 2010]. Eine schnelle und reversible Aktivierung oder Inaktivierung der Genexpression ist somit nicht möglich. Es ist daher vorteilhaft weitere und besser regulierbare Promotoren zu kennen. Besonders bei toxischen oder inaktivierten Proteinen könnte dies für das Zellwachstum günstig sein. Transkriptom-Studien und Analysen der Promotor-Regulierung könnten helfen, das Repertoire an zur Verfügung stehenden, regulierbaren Sequenzen zu erweitern. Dadurch könnten Kenntnisse über Promotoren erlangt werden, die mit einem entsprechenden Agens je nach Bedarf induziert oder reprimiert werden können, wie etwa beim LacZ-Promotor. Generell ist das natürliche Expressionsniveau vieler Proteine sowie auch die gebildete Zellmasse einiger Archaeen zu gering für eine effektive Proteinreinigung aus dem Zelllysats. Daher kann durch die Kombination der entsprechenden kodierenden Sequenz mit einem stark aktivierbaren Promotor die Ausbeute an Protein erhöht werden. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass eben eine starke Erhöhung des Expressionsniveaus bei inaktiven Mutanten sowie toxischen oder hydrophoben Proteinen eventuell zu einer Verminderung der Vitalität der produzierenden Zellen führen kann.

6.1.2. Die Simvastatin Selektion

Da *P. furiosus* zum Wachsen auf nährstoffreiche Substrate angewiesen ist und zudem kein auxotropher Stamm zur Verfügung stand, musste eine Antibiotika-basierte Selektionsstrategie zur Etablierung von genetischen Manipulationen verwendet werden. Bei Selektionen mit Antibiotika kann zumeist relativ unabhängig vom verwendeten Kulturmedium - auch in Flüssigmedium konstanter Selektionsdruck sichergestellt werden. Insbesondere bei der Selektion von mutierten Stämmen mit starken phänotypischen Wachstumsdefiziten haben sich in diesem Zusammenhang definierte Minimalmedien als wenig praktikabel herausgestellt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Studien belegen, dass Simvastatin sowohl für die Integration von Shuttle-Vektoren (vgl. Kapitel 2) als auch für chromosomale Manipulationen durch Gendeletionen (vgl. Kapitel 3) oder Substitutionen (vgl. Kapitel 4) verwendet werden kann. Die für die Veränderungen des Genoms erschaffenen Konstrukte rekombinieren dabei effektiv, wobei eine Wechselwirkung der entsprechenden Resistenzmarker-Sequenzbereiche mit dem Genom nicht beobachtet wurde. Dies bedeutet, dass durch die Verwendung der *hmgcr*-Genkopie aus *T. kodakarensis* die unerwünschte Rekombination des Markergens mit dem endogenen *hmgcr*-Gen in *P. furiosus* effizient verhindert werden kann.

Spontane Resistenzen. Auftretende Spontanresistenzen der *Thermococcales* gegenüber Simvastatin gehen oft mit einer Veränderung des Promotorbereiches des endogenen *hmgcr* Gens einher, welche die Produktion des Proteins begünstigt [Lipscomb *et al.*, 2011, Hileman und Santangelo, 2012]. Dieses Phänomen wurde bereits früher bei Archaeen beobachtet [Lam und Doolittle, 1992] und demonstriert, dass die Resistenz gegenüber Simvastatin eindeutig durch eine Überproduktion der HMGCR und nicht durch die Modifikation des Proteins verursacht wird. Dieses Wissen war ursprünglich die Grundlage der Strategie zur Selektion mit Simvastatin [Lam und Doolittle, 1992]. Daher sind die regelmäßig entstehenden Spontanresistenzen wenig überraschend. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Veränderungen in *P. furiosus* wurde ferner beobachtet, dass zum Teil im Anschluss an die Transformation explizit nur die Resistenzkassette ins Genom von *P. furiosus* rekombiniert wurde. Die weiteren Bereiche des DNA-Konstruktes zur genetischen Modifikation wurden jedoch nicht integriert oder es konnten die Zellen mit entsprechendem Genotyp, eventuell aufgrund eines signifikanten Wachstumsnachteils, nicht selektiert werden. Da, wie beschrieben, auch spontane Resistenzen gegen Simvastatin entstehen können und die Zellen dadurch meist im Vergleich zu den geplanten Mutanten deutlich schneller wachsen, könnten die eigentlich gewünschten Mutanten im Flüssigmedium schnell von den spontan resistenten Zellen und denjenigen mit integriertem Resistenzmarker verdrängt bzw. überwachsen werden. Weder die Phase der Selektion noch das Verhältnis der gewünschten Transformanten bzw. spontan resistenter Zellen kann von Außen beurteilt oder frühzeitig bestimmt werden. Eine mögliche Lösung stellt eine unmittelbar nach der Transformation stattfindende Selektion der Zellen auf Gelriteplatten mit Simvastatin dar. Jedoch ist diese Vorgehensweise noch nicht vollständig optimiert und daher momentan nicht sehr effektiv. Zusätzlich wird aufgrund der schwachen selektiven Wirkung von Simvastatin die Anwendung dieser Selektionsstrategie zunehmend vermieden. Obwohl bei den bisher etablierten Shuttle-Vektoren gute Transformationseffizienzen und eine stabile Replikation beobachtet wurde, kann auch in diesen Fällen das Auftreten von spontanen Resistenzen

nicht ausgeschlossen werden. Während die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten einfachen Gen-deletionen und Substitutionen, also etwa die Deletion von *TrmBL2* (vgl. Kapitel 3) hinsichtlich der Transformations- und Selektionsprozedur der Zellen schnell und einfach praktiziert werden konnten, war die Etablierung von weiterreichenden Modifikationen bei *P. furiosus*, wie etwa der mutanten RpoH E62K-RNAP (vgl. Kapitel 4), aufwändiger.

Komplexe DNA-Konstrukte. Mit steigender Komplexität der genetischen Manipulation bzw. des dafür benötigten DNA-Konstruktes erhöht sich anscheinend die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Rekombinationsereignisse. Dieses Phänomen wurde bereits bei Konstrukten für einfache Crossing-Over-Rekombinationen bei *T. kodakarensis* beobachtet und scheint unabhängig vom verwendeten Selektionssystem zu sein [Santangelo *et al.*, 2007]. Durch repetitive homologe Sequenzen lässt sich der Verlauf der Rekombination schwer beeinflussen und die Variation der potentiell entstehenden Genotypen steigt. Neben der Komplexität des DNA-Konstruktes zur Manipulation könnten auch weitere Faktoren den Verlauf der Rekombinationsereignisse bzw. die Effizienz der entstehenden gewünschten Mutanten beeinflussen. Teilweise erschien der Verlauf der Rekombinationsereignisse zugunsten der wt Sequenz verschoben zu sein, wobei simultan die Simvastatin-Resistenzkassette stets effektiv integriert wurde. Es wurde jedoch nicht näher untersucht, ob hierbei die Funktion des veränderten, kodierten Proteins zusätzlich einen Einfluss auf die Erfolgsrate der genetischen Manipulation hat. Das bedeutet, dass nur darüber spekuliert werden kann, ob die genetische Manipulation von Proteinen, die nicht für die Zellvitalität unerlässlich sind im Vergleich zu essentiellen Proteinen, eine höhere Erfolgswahrscheinlichkeit hat. Obwohl keine direkt vergleichende Studie über die Rekombinationseffizienzen von modifizierten essentiellen Genen gegen nicht-essentielle Gene durchgeführt wurde, trat zumindest bei dieser Arbeit das Problem der alleinigen Integration des Resistenzgens für beide Gentypen gleichermaßen auf. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Art des veränderten Gens oder die Position im Chromosom einen Einfluss auf den Erfolg der Modifikation hat.

Mischgenome. Generell zeigten sich -sowohl in dieser als auch in anderen Arbeitsgruppen- zum Teil Probleme mit Wildtyp 'Verunreinigungen' bzw. 'Mischgenomen', deren Entstehung zurzeit ungeklärt ist [Lipscomb *et al.*, 2011]. Es ist bekannt, dass das Chromosom von *P. furiosus* zeitweise oder permanent polyploid vorliegt [Matsunaga *et al.*, 2001]. Daher besteht die Möglichkeit, dass zum Zeitpunkt der Transformation mehrere Genomkopien in den Zellen vorlagen, was eine effiziente genetische Veränderung unmöglich macht. Jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass durch Interaktionen und genetischen Austausch der Zellen in der Selektionsphase nachträglich die Anzahl der Chromosomen und damit der Rekombinationsmöglichkeiten erhöht wird. Ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Stämmen mit Mischgenomen und der Anwendung des Simvastatin-Selektionssystems ist auch hier nicht erkennbar. Versuche, die möglichen Interaktionen durch die umgehende Vereinzelnung der Zellen nach der Transformation zu umgehen, gestalteten sich aufgrund der relativ geringen Transformationseffizienz und der reduzierten Vitalität der Zellen direkt nach der Transformation schwierig. Wie vorher erwähnt, kann durch weitere Optimierung der Methodik die Erfolgsrate der durch direkte Plattierung se-

lektierten Transformanten erhöht werden. In diesem Zusammenhang sollte zudem der Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die Anzahl der Genomkopien in *P. furiosus* getestet werden. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass bei vielen Archaeen nicht nur mehr als ein Chromosom pro Zelle vorliegen kann, sondern bei einigen Arten auch die vorliegende Anzahl mit der Wachstumsphase der Zellen variiert [Lundgren und Bernander, 2005]. Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie häufig 'Mischgenome' nach einer Transformation entstehen, müssten die Rekombinationsereignisse der verschiedenen Ansätze überprüft werden. Dadurch könnte geklärt werden inwieweit etwa Anzuchttemperatur der kompetenten Zellen oder deren Wachstumsphase den Transformationsverlauf beeinflussen. Natürlich könnten auch weitere Faktoren wie etwa Abwandlungen der Medienbestandteile oder Veränderungen der Selektionsdurchführung helfen, die Anzahl der vorliegenden Chromosomen zu kontrollieren, um so stringendere Transformationsbedingungen zu schaffen und die Rekombinationseffizienz in Richtung des gewünschten Genotyps zu optimieren.

Fazit Insgesamt betrachtet birgt die Verwendung des Simvastatin-Resistenzmarkers bei genetischen Manipulationen von *P. furiosus* viele Vorteile. Mit der Simvastatin-basierten Selektionsstrategie besteht die Möglichkeit, kostengünstig und unabhängig von einem speziellen Wirtstamm selbst in nährstoffreichem Medium und auch bei hohen Temperaturen transformierte Zellen zu selektieren. Trotz der zum Teil auftretenden spontanen Resistenzen hat sich das Simvastatin-Selektionssystem gerade bei der Deletion von nicht-essentiellen Proteinen und der Produktion von Proteinen über das Shuttle-Vektor-System bewährt. In diesen Fällen bietet das System eine einfache, schnelle und zuverlässige Methodik, durch die in relativ kurzer Zeit effektiv die gewünschten Proteine in *P. furiosus* deletiert oder produziert werden können. Zudem sind die durch die Etablierung der Simvastatin-Selektion gewonnenen Erkenntnisse eine wichtige Basis für die Optimierung der Transformationsprozedur und der Entwicklung weiterer Selektionsstrategien.

6.1.3. Das markerlose Simvastatin-XGPRT-System

Das etablierte Selektions-/Gegenselektionsverfahren basiert auf der Empfindlichkeit der *Thermococcales* gegenüber dem zytotoxischen Basenanalogen 6-Methylpurin. Dieses wird nach der Aufnahme in die Zellen von Enzymen des Purin-Biosynthese-Weges umgesetzt und in Makromoleküle, vor allem chromosomale DNA, eingebaut. Dadurch werden die DNA-Replikation und Reparaturmechanismen empfindlich gestört, was für die Zellen letal ist. Die Untersuchung von *T. kodakarensis*-Stämmen, welche spontane Resistenzen gegen 6-MP gebildet hatten, zeigten, dass die Resistenz durch Mutationen in *tk0664* bzw. durch Inaktivierung der daraus kodierten Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase erzeugt wird [Santangelo *et al.*, 2010, Čuboňová *et al.*, 2013]. Durch das Fehlen der XGPRT-Enzymaktivität erlangt auch *P. furiosus* Resistenz gegenüber 6-MP, was den Einsatz von *pf1950* als Negativ-Selektionsmarker ermöglicht. Um die Selektions-/Gegenselektionsstrategie durchführen zu können, muss der XGPRT-Marker mit einem positiven Selektionsmarker gekoppelt werden, welcher für die Integration der Resistenzkassette ins Genom des Organismus geeignet ist. Anwendung fand hier erneut der Simvastatin-Resistenzmarker, welcher durch Produktion der HMGCR die Resistenz gegenüber Simvastatin vermittelt.

6-MP Selektion. Bezüglich der Feststellung der Eignung von 6-MP als selektives Agens waren vorab Tests der Wachstumsfähigkeit von *P. furiosus*-Wildtyp bei verschiedenen 6-MP-Konzentrationen durchgeführt worden [Schmutzler, 2011]. Durch diese konnte sichergestellt werden, dass das Wachstum der Wildtypzellen auf Gelriteplatten mit 50 μ M 6-MP über mehr als 48 Stunden effektiv gehemmt wird. Jedoch wurde dabei gleichfalls die begrenzte Eignung von 6-MP zur Selektion in Flüssigkulturmedium deutlich. Selbst bei einer Konzentration von 1 mM 6-MP konnte bereits nach 24 Stunden ein deutliches Wachstum des wt Stammes beobachtet werden. Demnach ist für Selektionen mit 6-MP eine Vereinzelung der Transformanten auf Gelriteplatten unumgänglich, verläuft jedoch dafür höchst effektiv und zuverlässig. Eine weitere Besonderheit wurde bei der Verwendung von 6-MP zur Gegenselektion festgestellt. Wird 6-MP eingesetzt um die Entfernung der Resistenzmarker aus dem Genom zu induzieren, deren Integration vorher durch die Selektion mit Simvastatin gefördert wurde, ist es essentiell, dass zu diesem Zeitpunkt das Medium und die Zellen frei von Simvastatin sind. Durch Rückstände an Simvastatin wird die Bildung der markerlosen Mutante verhindert. Zwar sind jene Zellen im Wachstum begünstigt, die durch eine homologe Rekombination den XGPRT-Marker aus dem Genom entfernten. Aufgrund des noch bestehenden Selektionsdrucks wird dabei jedoch das Simvastatin-Markergen im Genom behalten. Daher wurden die Zellen der verifizierten Intermediär-Mutante, wie beschrieben, mehrmals in selektionsdruck-freiem Flüssigkulturmedium (+8 mM IMP+GMP) ohne Simvastatin überimpft. Dadurch wurden alle Rückstände von Simvastatin im Medium und in den Zellen entfernt, bevor die Zellen auf den selektiven Gelrite-Vollmedium-Platten mit 50 μ M 6-MP vereinzelt wurden.

Purin-Metabolismus. Bisher ist der Salvage-Pathway bei *P. furiosus* nur wenig charakterisiert, sodass keine gesicherten Aussagen über alternative Wege der Purin-Synthese bei den Δ XGPRT-Stämmen getroffen werden können. Im Gegensatz dazu sind die Salvage-Pathway-Mechanismen von Methanogenen oder Halophilen gut untersucht [Worrell und Nagle, 1990, Stuer-Lauridsen und Nygaard, 1998]. Bei *M. thermoautotrophicum* wurden zudem einige Übereinstimmungen der enzymatischen Komponenten gefunden, welche auf einen ähnlichen Purin-Biosynthese-Weg bei *P. furiosus* hindeuten. Während ein Großteil des Purin-Metabolismus bei *P. furiosus* noch nicht aufgeklärt werden konnte, ist die Funktion der XGPRT bekannt. Das Enzym katalysiert die Umwandlung der Basen Guanin und Xanthin in die jeweiligen Nukleotid-Monophosphate GMP und XMP. Eine Möglichkeit der Mutante, die Deletion von PF1950 auszugleichen ist demnach eine gesteigerte De-Novo-Biosynthese der Nukleotide, was jedoch für den Organismus extrem energieaufwändig ist. Es existieren auch Nebenreaktionen im Salvage-Pathway, durch die verschiedene Basenderivate ineinander überführt werden können. Ein Mangel an GMP und XMP kann daher auch durch Umwandlung aus Adenin ausgeglichen werden. Durch vermehrte Adenin-Aufnahme und entsprechende enzymatische Umwandlung wird dabei die AMP-Konzentration in den Zellen erhöht. AMP wiederum kann über verschiedene Enzymaktivitäten in XMP bzw. GMP überführt werden. Eine solche gesteigerte Adenin-Aufnahme wurde auch bei GPRT und HPRT (Guanin- und Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase)-defizienten *Hb. halobium* Mutanten beobachtet [Stuer-Lauridsen und Nygaard, 1998].

P. furiosus kodiert ein Gen für eine weitere XGPRT-Variante (pf0039) im Genom. Dieses Enzym ist

jedoch nur zu 34 % mit der Aminosäuresequenz von PF1950 identisch und um 62 Aminosäuren verkürzt. Weder Expressionsniveau noch Aktivität oder Substratspezifität von PF0039 wurden bisher näher untersucht. Jedoch konnte bei der Selektion mit 6-MP kein inhibierender Einfluss durch eine eventuelle Umsetzung durch PF0039 festgestellt werden. Auch bei *T. kodakarensis* ist eine analoge Enzymvariante (TK1737) annotiert. Auswirkungen oder eine Beeinträchtigung des 6-MP-Selektionssystems durch TK1737 wurden bisher nicht beschrieben [Santangelo *et al.*, 2010].

MURPf27. Als Grundlage für künftige Mehrfachdeletionen bei *P. furiosus* wurde ein Stamm generiert, bei dem das Gen der *xgp*rt selbst markerlos deletiert wurde. Die Notwendigkeit eines modifizierten *P. furiosus*-Wirtstammes wirkt sich limitierend auf die Anwendbarkeit des Systems aus. Trotz dieser Defizite bietet diese Selektionsstrategie ein effizientes System zur Etablierung von Mehrfach-Mutanten und eine gute Basis zur Einführung weiterer Selektions- und Gegenselektionsverfahren. Der zuerst etablierte *P. furiosus*-Stamm MURPf12 (Δ XGPRT::Tko SimR), durch den die Auswirkungen der Deletion von *pf*1950 untersucht werden sollten, erwies sich bei Kultivierung in Standardflüssigmedium in Wachstum und Morphologie als unauffällig. Jedoch ist für eine stringente Selektion mit 6-MP im Flüssigmedium die Reduktion der organischen Zusätze nötig. Unter den benötigten Kultivierungsbedingungen sind MURPf12 und auch MURPf27 jedoch deutlich in ihrer Vitalität eingeschränkt. Daher wurde für 6-MP die Selektion der Zellen auf Gelrite-Platten bevorzugt, welche im Vergleich zum Flüssigmedium selbst bei niedrigeren 6-MP-Konzentrationen eine effektive Selektion der Zellen erlauben. Um das beobachtete Wachstumsdefizit der *xgp*rt-Deletionsmutanten in Flüssigkulturmedium mit verminderter Organik-Konzentration zu reduzieren, wurde dem Medium zusätzlich IMP+GMP beigesetzt. Dadurch wurde das Wachstumsvermögen der XGPRT-Deletionsmutanten deutlich verbessert. Dennoch blieben die beobachteten, maximal erreichten Zelldichten deutlich unter den des wt Stammes bei identischen Bedingungen oder der desselben Stammes kultiviert in Vollmedium. Gerade bei Wachstumsanalysen mit MURPf27, der als Ausgangsstamm für markerlose genetische Manipulationen dient, ergeben sich durch dessen Wachstumsdefizit Schwierigkeiten bei der Charakterisierung der erzeugten Mutanten. Durch das sehr unterschiedliche Wachstumsverhalten von MURPf27 und wt *P. furiosus* wird die Bestimmung des Effekts von weiteren Veränderungen des Organismus auf dessen Wachstum erschwert. Für eine optimale Identifizierung und Charakterisierung von Phänotypen ist eine geeignete Referenz essentiell. Zudem sind für solche Analysen zumeist spezielle Kultivierungsbedingungen nötig, welche unter Umständen aufgrund der Wachstumsdefizite nicht realisierbar sind. Weiterhin waren auch die Transformationen von MURPf27 negativ von der eingeschränkten Vitalität der Zellen beeinflusst. Momentan sind Transformationen bei MURPf27 nur in Flüssigvollmedium unter GMP-Zusatz möglich. Dennoch ist das Wachstum der Transformanten verzögert und damit muss mehr Zeit für die Selektion aufgewendet werden.

DNA-Konstrukte Weitere Komplikationen entstehen auch durch die Komplexität der DNA-Konstrukte, welche für die Manipulationen mit der 'Pop-in/Pop-out'-Methode erstellt werden müssen. Für genetische Modifikationen können bei MURPf27 eine kombinierte Simvastatin/XGPRT-Resistenzkassette über flankierende homologe Sequenzen an der entsprechenden Stelle integriert werden und dabei den endogenen Bereich ersetzen. Konstrukte, deren Zweck die Modifikation von bestimmten Genen ist, beinhalten dementsprechend zusätzlich die veränderten Genvarianten und eventuell auch regulatorische Sequenzen. Wie bereits vorher erläutert (vgl. 6.1.2), verursachen diese sowohl bei ihrer Erstellung, als auch bei den Transformationen in *P. furiosus* einen erhöhten Arbeitsaufwand, bzw. erhöhen die Wahrscheinlichkeit an unerwünschten Rekombinationsereignissen. Wird für die Transformation zirkuläre Plasmid-DNA eingesetzt, wird durch ein einfaches Crossing-Over-Ereignis das gesamte Plasmid ins Genom der Zwischenmutante integriert. Zwar ist die Konstruktion der DNAs für Transformationen mit einfachen Crossing-Over-Ereignissen wesentlich effizienter als für diejenigen, welche über zweifache Crossing-Over-Ereignisse integriert werden (vgl. Abb. 5.3 und 5.4). Jedoch können durch die Gegenselektion mit 6-MP bei der Zwischenmutante zwei alternative Rekombinationsereignisse stattfinden, von denen nur eines zum gewünschten Genotyp führt. Durchschnittlich müssen daher mehr Klone untersucht werden um eine Mutante mit der gewünschten Mutation zu identifizieren. Entspricht bei der Verwendung von Single-Crossing-Over-Konstrukten die Genomstruktur in allen Fällen der des Ausgangsstammes, der für die Transformationen eingesetzt wurde, ist dies ein Indiz dafür, dass der gewünschte Genotyp inkompatibel mit der Vitalität des Stammes ist. Beim Einsatz von DNA-Konstrukten für doppelte Crossing-Over-Ereignisse kann in diesen Fällen nicht unterschieden werden, ob eine Transformation der Zellen aufgrund von Fehlern in der Prozedur nicht möglich war oder ob die Veränderung von essentiellen Proteinen die Entstehung der gewünschten Mutanten verhindert.

Fazit. Trotz der Einschränkungen bei der Verwendung des Wirtsstammes für die Erstellung markerloser Mutanten und der Notwendigkeit von weiteren Optimierungen der Transformations- und Selektionsbedingungen der markerlosen Mutanten ist die Etablierung des Simvastatin-XGPRT-Systems ein wichtiger Schritt für die Bereitstellung genetischer Manipulationsmethoden bei *P. furiosus*. Stehen nur eine begrenzte Anzahl an Selektionsstrategien zur Verfügung, ist die Rückgewinnung von Selektionsmarkern über markerlose Systeme für die Erzeugung von Doppel- oder Dreifachmutanten unerlässlich. Somit kann das beschriebene System verwendet werden, um Mehrfachmutanten zu etablieren. Gleichzeitig sind die dadurch erworbenen Kenntnisse für die Umsetzung weiterer Selektionsstrategien für *P. furiosus* wiederum hilfreich.

6.2. Ausblick

Parallel zu den in dieser Arbeit vorgestellten Projekten wurden am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg auch weitere Projekte zur Optimierung und Erweiterung der genetischen Hilfsmittel für *P. furiosus* durchgeführt. Die Grundlagen der hierfür angewendeten Strategie soll im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Agmatin/PdaD-Selektion. Polyamine sind kleine polykationische Moleküle, welche eine essentielle Rolle bei der Nukleinsäure- und Proteinsynthese sowie der Zellentwicklung spielen. Agmatin ist ein Baustein und Ausgangsstoff von Polyaminen wie Spermin, Cadaverin, Spermidin und Putrescin [Oshima *et al.*, 2011], welche für alle Lebewesen in den drei Domänen des Lebens essentiell sind. Bei hyperthermophilen Archaeen konnten zudem essentielle langkettige Polyamine charakterisiert werden, deren Funktion in der Stabilisierung und dem Schutz der Nukleinsäuren vor Hitzedenaturierung liegt [Hamana *et al.*, 2003, Terui *et al.*, 2005]. Bei *T. kodakarensis* wird Agmatin selbst wiederum durch eine Pyruvoyl-abhängige Arginin-Decarboxylase (PdaD, TK0149) aus Arginin gebildet [Morimoto *et al.*, 2010] und steht dann als Komponente für die Putrescin-Biosynthese zur Verfügung [Fukuda *et al.*, 2008]. Die Aminosäure Arginin kann von den Zellen aus dem Kultivierungsmedium bezogen werden, wohingegen die Konzentration von Agmatin in den Standard-Vollmedien meist sehr niedrig ist. Durch die Deletion der PdaD kann Arginin nicht mehr zu Agmatin decarboxyliert werden, wodurch der erste Schritt der essentiellen Polyamin-Synthese gestört wird. Daher ist das Wachstum von *T. kodakarensis* bei Deletion von *tk0149* von der Zugabe an sowohl Arginin als auch Agmatin in ausreichender Konzentration zum Kulturmedium abhängig. Bei Komplementierung des Deletionsstammes mittels DNA, welche zur Produktion von aktiver PdaD führt, können die entsprechenden Transformanten direkt über Selektion auf nährstoffreichem Medium ohne Arginin- und Agmatin-Zusatz bestimmt werden [Santangelo *et al.*, 2010]. Demzufolge kann bei einem Deletionsstamm das *tk0149*-Gen als Resistenzmarker zur Vermittlung von chromosomalen Manipulationen oder der stabilen Integration eines Expressionsvektors [Ikeuchi *et al.*, 2010] verwendet werden. Ein großer Vorteil der Agmatin-basierten Selektion ist, trotz der Limitierung auf TK0149-defekte Wirtsstämme, die strikt letale Wirkung der Agmatin-Auxotrophie sogar in nährstoffreichem Vollmedium.

Das markerlose XGPRT-PdaD-System. Auch *P. furiosus* ist als hyperthermophiler Organismus auf Polyamine und im Speziellen auf langkettige Polyamine angewiesen. Die entsprechende PdaD-Aktivität erfüllt bei *P. furiosus* das Protein PF1623. Durch die markerlose Deletion von *pf1623* bei *P. furiosus* Δ XGPRT wurde ein Stamm erzeugt, der für sukzessive Gendeletionen und Modifikationen verwendet werden kann [Lindenthal, 2012]. Der Wirtsstamm ist damit sowohl resistent gegenüber 6-MP als auch Agmatin-auxotroph und muss somit für Transformationen mit Agmatin-Zusatz kultiviert werden. Mit der Kombination der XGPRT- und PdaD-Resistenzmarker in einer Resistenzkassette wird die Integration des entsprechenden Konstruktes in den Wirtsstamm bei Selektion ohne Agmatin-Zusatz gefördert. In einem zweiten Selektionsschritt kann dann durch 6-MP die erneute Entfernung der Resistenzkassette durch homologe Rekombination induziert werden. Das markerlose XGPRT-PdaD-System und der entsprechende Wirtsstamm werden derzeit

genutzt, um sequenziell komplexe Stoffwechselwege bei *P. furiosus* zu modifizieren [Grünberger, 2013].

7. Zusammenfassung

Das für *P. furiosus* etablierte genetische System wurde verwendet, um verschiedene Komponenten des Transkriptionsapparates und des Stoffwechsels von *P. furiosus* zu analysieren und im Zuge dieser Anwendungen das Spektrum der verfügbaren genetischen Methoden zu erweitern.

Mit Hilfe eines Shuttle-Vektor-Systems wurden mutierte RpoA"-Untereinheiten der RNAP in *P. furiosus* produziert. Dadurch wurde bewiesen, dass es bei *P. furiosus* möglich ist auch defekte, mutierte Proteine zu produzieren und durch die simultan vorhandenen wt Proteine die Vitalität der Zellen zu gewährleisten. Assemblierte RNAPs mit integrierter, modifizierter RpoA"-Untereinheit konnten aus den Zellen isoliert und für Struktur-Funktions-Analysen eingesetzt werden. Diese bestätigten die Inaktivierung der RNAP durch die Deletion der Tip-Region des Trigger Loops bzw. die reduzierte Aktivität aufgrund einer Aminosäuresubstitution an Position 87.

Bei der Charakterisierung des putativen Transkriptionsregulators TrmBL2 wurde ein *P. furiosus*-Deletionsstamm generiert, welcher für Wachstums- und Genexpressionsanalysen eingesetzt wurde. Auch erfolgten *in vitro* Untersuchungen mit TrmBL2, welches über die Integration einer chromosomalen Proteintagsequenz direkt aus *P. furiosus* gereinigt wurde. Die erhaltenen Daten erbrachten keinen Hinweis auf eine Funktion von TrmBL2 als Transkriptionsregulator des Zuckerstoffwechsels. Jedoch besitzt TrmBL2 eine Vielzahl an chromosomaler DNA-Bindestellen und auch *in vitro* starke DNA-Bindeaktivität. Da zudem eine hohe Thermostabilität von TrmBL2 unter Hitzeschock-Bedingungen analysiert wurde, ist nach jetzigem Kenntnisstand davon auszugehen, dass TrmBL2 dem Schutz freier chromosomaler DNA-Bereiche vor Hitzeschädigungen dient.

Da durch einen einzelnen Aminosäureaustausch eine chimäre Rp5H-Untereinheit erfolgreich für Komplementation in einem Rpb5-Hefedeletionsstamm aktiviert werden konnte, wurde ein entsprechender Komplementationsansatz auch in *P. furiosus* durchgeführt. Durch das genetische System wurde die endogene *rpoH*-Gensequenz durch eine Variante mit einer Basensubstitution, welche zum Aminosäureaustausch E62K führt, ersetzt. Hingegen ein chimäres Rp5H-Konstrukt aus N-terminalem Anteil von *rpb5* aus Hefe und *rpoH* aus *P. furiosus* als C-terminaler Anteil konnte anstatt des wt *rpoH*-Gens nicht etabliert werden. Sowohl der Vergleich der Vitalität von wt *P. furiosus* und des RpoH E62K-Expressionsstammes, als auch die mit isolierter RpoH-E62K-RNAP durchgeführten *in vitro* Analysen ergaben keine signifikante Veränderung des Wachstums bzw. der Aktivität der assemblierten RNAPs. Demnach hat der Aminosäureaustausch trotz einer Ladungsumkehrung an dieser Position keinen Einfluss auf die Aktivität der RNAP; mögliche Auswirkungen auf Proteinwechselwirkungen bleiben zu klären.

Zur Optimierung des Chitinabbaus von *P. furiosus* wurden die im Genom von *P. furiosus* getrennt vorliegenden kodierenden Sequenzen zweier Chitinase-Einheiten durch eine Basendeletion zu einer kodierenden Sequenz für eine fusionierte Chitinase kombiniert. Wachstumsanalysen und Messungen des Energiegehalts und des Stoffumsatzes der Zellen ergaben ein gesteigertes Wachstum und sichtbaren Abbau des Chitins durch den mutierten *P. furiosus*-Stamm. Die Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass bei *P. furiosus* das Gen der Chitinase ursprünglich als eine durchgängige Basensequenz vorlag und erst vor jüngerer Zeit durch die Insertion einer Base zwei getrennte Chitinase-Einheiten erzeugt wurden.

8. Summary

The genetic system developed for *P. furiosus* was used to analyse various elements of the transcription apparatus as well as the metabolism of *P. furiosus*. In the course of their application the range of available genetic tools was expanded.

The shuttle vector system was used to express mutated RpoA” subunits of the *P. furiosus* RNAP. Therefore, even defect and mutated proteins can be expressed in *P. furiosus* as proven with this study. The simultaneously present wildtype version of the affected protein ensures viability of the cells. Assembled RNAPs with integrated, modified RpoA” subunits could be extracted from the cells and could be used for structure-function analysis. Thereby the inactivation and the reduced activity of the RNAP, caused by the deletion of the tip region of the trigger loop and an amino acid substitution at position 87, were confirmed.

To characterize the putative transcription regulative protein TrmBL2 a *P. furiosus* deletion strain was established and used for comparative studies of its growth behaviour and gene expression values. In a second *P. furiosus* strain the chromosomal gene sequence of *trmBL2* has been modified by adding a sequence for a protein tag. TrmBL2 purified from the cells was used for *in vitro* studies of TrmBL2 activity. The generated data gave no hint of a functional participation of TrmBL2 in transcriptional regulation events of sugar metabolism. However, a multitude of DNA-binding sites of TrmBL2 on chromatin of *P. furiosus* could be defined just as an high DNA-binding activity of TrmBL2 *in vitro*. Additionally, a high thermal stability of TrmBL2 under heat shock condition was measured. With current state of the art, it can be assumed that TrmBL2 provides the maintenance and prevention of free chromosomal DNA sections from harmful influences of high temperatures.

A single amino acid substitution leads to activation of a chimeric Rpb5H subunit for successful complementation in a Rpb5 deficient yeast strain. Therefore, a respective complementation assay was performed in *P. furiosus*. Using the genetic system, the endogenous *rpoH* gene sequence was replaced by a version containing a DNA point mutation, leading to the exchange of the glutamate at position 62 against lysine in the expressed protein. In contrast, a chimeric Rpb5H construct containing the N-terminal part of *rpb5* from yeast and the *rpoH* gene sequence of *P. furiosus* as C-terminal part could not be introduced to *P. furiosus* to replace the wildtype *rpoH* gene. Both the comparison of the vitality of *P. furiosus* wildtype and RpoH E62K expression strain as well as the *in vitro* assays performed with isolated RpoH E62K RNAP indicated no significant changes in the growth behaviour of the strain and the activity of the assembled RNAPs. According to that, despite the inversion of the charge at this position, the exchange of the amino acid has no severe

influence to the activity of the RNAP. Possible implications to protein interactions remain to be resolved.

To optimise the chitin degradation of *P. furiosus* the coding sequences of the chitinase, appearing as two separated gene frames in the genome of *P. furiosus*, were fused to a single coding sequence by deletion of a DNA base. This leads to expression of a chitinase comparable to the enzyme of *T. kodakarensis*. Growth analysis as well as the measurement of the energy content and the metabolic rate of the cells resulted in increased growth and distinctly and visibly degradation of chitin by the mutated *P. furiosus* strain. These results confirm the assumption that the gene sequence of the chitinase in *P. furiosus* originally existed as one continuous gene sequence and was just separated into two chitinase units by the insertion of a DNA base in the recent past.

Anhang

1. Standard-Methoden und Materialien

Methoden, die nur in Zusammenhang mit einem bestimmten Projekt Anwendung fanden, sind im entsprechenden Kapitel detailliert beschrieben. Alle gängigen molekularbiologischen und biochemischen Methoden, auf die nicht näher eingegangen wird, wurden nach Standardprotokollen [Ausubel, 1987, Sambrook *et al.*, 1989, Sambrook *et al.*, 2001] durchgeführt. Enzyme wurden von den Firmen NEB Biolabs (Ipswich, USA), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) und Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Plasmide aus *E. coli* wurden mittels des Qiagen „Mini-Prep-Kits“ (Qiagen, Hilden) isoliert.

1.1. Molekularbiologische Methoden

Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung der Gesamt-DNA aus *P. furiosus* Die Präparation der Gesamt-DNA erfolgte durch reversible Bindung an eine Silika-Matrix mit dem Promega 'gDNA Tissue Kit' nach dem Herstellerprotokoll. Für die Präparation wurden 1-2 ml einer *P. furiosus* Kultur entnommen und die Zellen 5 Minuten bei 8.000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden, entsprechend der Herstellerangaben, mit Proteinase K aufgeschlossen und das Zelllysate mit RNase A behandelt, bevor es auf die Silika-Säulchen gegeben wurde. Die Konzentration wurde mit einem Spectrophotometer (NanoDrop, ND-1000) bestimmt.

Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* Zellen einer 5-ml-LB-Amp-Flüssigkultur der *E. coli* DH5 α -Klone wurden zur Plasmidisolierung verwendet. Je 4 ml der Kulturen wurden zentrifugiert (3 min bei 6.800 g in einer Tischzentrifuge). Die Extraktion der Plasmide wurde mit dem Kit zur Reinigung von Plasmid-DNA 'QIAprep Spin Miniprep Kit (50)' von Qiagen entsprechend den Angaben im Handbuch durchgeführt.

Ethanol- und Isopropanolfällung von DNA Die DNA-Lösung wurde mit 2,5 Volumen gekühltem Ethanol (96 %, -20 °C) und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5,3 versetzt und mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (bei 16.100 g und 4 °C für 15 min) und das Pellet mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde final in Tris-EDTA-Puffer (Tris, pH 8,0 10 mM, EDTA 0,1 mM) resuspendiert. Bei großen Volumen an DNA-Lösung wurde entsprechend eine Isopropanol-Fällung durchgeführt.

PCR [Mullis *et al.*, 1992]

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Oligonukleotidprimer. PCRs wurden zur Amplifikation von DNA-Sequenzen bei der Herstellung der Plasmide für die Transformationen oder zum Nachweis von DNA Sequenzen in den Mikroorganismen genutzt. Die in der PCR verwendeten Primer sind dabei zu DNA-Sequenzen komplementär, welche das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Die PCR erfolgt in mehreren Zyklen. In jedem Zyklus werden zuerst die beiden DNA-Stränge aufgeschmolzen und die Primer können sich in einer anschließenden Annealing-Phase an ihre komplementären Sequenzen hybridisieren. Die DNA-Polymerase bindet in der Elongationsphase an den Primer und ergänzt die fehlenden Nukleotide.

Standard-PCR Die Phusion-DNA-Polymerase ist von der DNA-Polymerase von *P. furiosus* abgeleitet. Sie besitzt eine zusätzliche Domäne zur Bindung von doppelsträngiger (ds)DNA, durch welche die Prozessivität der Polymerase stark erhöht wird. Die Phusion-DNA-Polymerase von New England Biolabs wurde zur Amplifikation und Fusion von DNA-Sequenzen für die Transformationsansätze verwendet. Die PCRs wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCRs wurden jeweils etwa 50 ng DNA, je 50 pmol der beiden PCR-Oligonukleotide und ein dNTP-Gemisch (Endkonzentration 0,2 mM pro dNTP) eingesetzt, die MgCl₂-Endkonzentration betrug 1,5 mM. Die PCRs wurden in 20-50 µl-Ansätzen im Thermocycler (Doppio Cyclyer, VWR) durchgeführt. Die Programme setzen sich aus einem 5-minütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C und 25-30 Zyklen bestehend aus Denaturierungs- (95 °C, 0,5-1 min), Hybridisierungsschritten (45-60 °C) und Elongationsschritten (72 °C; die Temperatur und die Länge der Syntheszeit stützte sich auf die Angaben des Herstellers der Polymerasen) sowie einem finalen 5-minütigen Verlängerungsschritt (72 °C) zusammen. Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei Seq-lab (Göttingen) oder bei Eurofins MWG (Ebersberg) hergestellt. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Standard-Agarosegelelektrophorese überprüft.

PCR-Fusion [Higuchi, 1990] Für die Fusions-PCRs wurde ebenfalls die Phusion-DNA-Polymerase verwendet. Die speziell für diese Ansätze designten Primer enthalten DNA-Abschnitte, die neben der Amplifikation eines bestimmten DNA Bereiches, auch komplementär zu einer davon verschiedenen Sequenz sind. Nach einer ersten Standardamplifikation der Fragmente können diese über die vorhandenen Überhänge in einer erneuten PCR miteinander fusioniert werden. In dem Fall, dass eine Verunreinigung von Primern aus der ersten PCR-Reaktion bei der Fusions-PCR störend wirkte, wurden die erzeugten Einzelfragmente vor ihrer Fusion präparativ über Agarosegelelektrophorese unter Anwendung des 'QIAquick Gel Extraction Kit' (Qiagen, Hilden) gereinigt. Für die Fusion wurden die Fragmente im äquimolaren Verhältnis (je nach Länge in einem Mengenbereich von etwa 10-20 ng) eingesetzt. Die übrigen Komponenten entsprachen -bis auf die Oligonukleotide, welche erst verzögert während der PCR-Prozedur zugegeben wurden- einem PCR Standard-Ansatz. Nach drei PCR-Zyklen ohne Primer und einer etwas erniedrigten Annealing-Temperatur der Zyklen erfolgte eine Zugabe von 0,1 µM der äußeren Primer. Anschließend wurde das gesamte Fusions-Fragment über 27 Zyklen unter Standardbedingungen amplifi-

ziert. Dementsprechend war hier die Synthesezeit des Elongationsschrittes auf die Gesamtlänge des Fusionskonstruktes eingestellt.

Kolonie-PCR Die Phire Hot Start II DNA Polymerase von Thermo Scientific wurde zum Nachweis von Veränderungen im Genom nach Transformationen und bei Kolonie-PCRs verwendet. Durch Kolonie-PCR wurde kontrolliert, ob die *E. coli* DH5 α -Zellen mit dem Vektor transformiert wurden. Kolonien der LB-Amp-Platten wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und Zellmaterial in je einen 20 μ l-PCR-Ansatz gegeben. Die PCRs mit der Phire Hot Start II DNA Polymerase wurden entsprechend den Herstellerangaben nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Zum Aufschluss der Zellen wurde der initiale Denaturierungsschritt auf mindestens 5 Minuten eingestellt.

Klonierungen

Restriktionshydrolyse Das PCR-Fusions-Fragment und der Vektor wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (vgl. Angaben im jeweiligen Kapitel) hydrolysiert. Es wurden 16 μ l des PCR-Produkts und 500 ng bis 1 μ g Vektor eingesetzt und je mit 20 Units Enzym sowie dem entsprechenden Reaktionspuffer des Enzyms in einfacher Konzentration und, bei Bedarf, BSA versetzt. Das Ansatzvolumen betrug je 20 μ l; die Inkubation erfolgte zumeist bei 37 °C für etwa 90 Minuten. Der hydrolysierte Vektor wurde anschließend einer Phosphatase-Behandlung mit 5 Units Phosphatase (CIP) und Phosphatase-Puffer unterzogen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Die Ansätze wurden danach über präparative Gelelektrophorese oder eine Silika-Matrix gereinigt und die Konzentration der isolierten DNA photometrisch (NanoDrop, ND-1000) bestimmt.

Ligation Das Volumen eines Ligationsansatzes betrug je 20 μ l. Das Verhältnis von eingesetztem Vektor (50 ng) zu DNA-Fragment betrug 3:1. Die Ligation wurde mit 5 Units der T4 DNA-Ligase und einfach konzentriertem Ligasepuffer durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde eine Stunde bis über Nacht bei 16 °C inkubiert; anschließend wurde die Ligase 10 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert. Bei Bedarf wurde der Ansatz mit Hilfe des 'Wizard SV Gel and PCR Clean-Up'-Systems von Promega entsalzt.

Hitzeschock-Transformation in *E. coli* [Hanahan, 1983] Zu 90 μ l chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen, hergestellt mittels MgCl₂-Methode nach Inoue [Inoue *et al.*, 1990], wurden auf Eis 5 μ l Ligationsansatz (ca. 5 ng DNA/ μ l) zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Hitzeschocktransformation der Zellen für 90 Sekunden bei 42 °C. Die Ansätze wurden anschließend 2 min auf Eis gelagert, mit 800 μ l SOC-Medium versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden 100 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Amp-Platten plattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert (vgl. Seite xii).

SOC-Medium: NaCl 10 mM, Hefeextrakt 0,5 %, Trypton 2,0 %, KCl 2,5 mM, ad 50 ml H₂O_{bidest.} (Vor Gebrauch je 1/100 Volumen steriler 1 M MgCl₂-, 1 M MgSO₄- und 2 M Glukoselösung zugeben)

Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektralphotometers (peqLab, Erlangen) bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht im Falle dsDNA einer Konzentration von 50 µg/ml und im Falle von RNA 40 µg/ml [Sambrook *et al.*, 1989]. Das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm sollte für eine reine Lösung zwischen 1,5 und 2 liegen [Wilfinger *et al.*, 1997].

Auftrennung von DNA-Fragmenten Zur Überprüfung eines PCR-Produktes wurden die DNA-Fragmente in einem 1,0%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt [Sambrook *et al.*, 1989]. Als Größenstandard diente der 1-kb-DNA-Ladder von Fermentas. Die Elektrophorese erfolgte meist für 30 - 45 Minuten in 1x TBE Puffer bei 70 mA/100 V und Raumtemperatur. Nachweis und Dokumentation der DNA über das darin interkalierte Ethidiumbromid erfolgte im Anschluss mit einem UV-Transilluminator (Biodocit, 366 nm, UVP, San Gabriel, USA).

10x-TBE: Tris 900 mM, Borsäure 900 mM, EDTA 20 mM

Agarosegel 1,0 %: Agarose 0,3g, 10x-TBE 3 ml, Ethidiumbromid 1,5 µl (10 µg/ml; EK 0,5 µg/ml), ad 30 ml H₂O_{bidest.}

6x-Auftragspuffer: Bromphenolblau 0,1 %, Saccharose 50 %, Harnstoff 4M, EDTA 50 mM

Southern Blot

Der Southern Blot dient dem Nachweis von Genen oder DNA-Sequenzbereichen im Genom eines Organismus. Dazu muss ein markiertes DNA-Fragment erzeugt werden, das homolog zu der Sequenz ist, die im Genom detektiert werden soll. Die zu testende DNA wird geschnitten, elektrophoretisch getrennt und anschließend nach Denaturierung auf eine Nylonmembran übertragen und dort fixiert. Ist das Zielgen in der DNA vorhanden, kann die markierte Sonde bei der Inkubation mit dem gesuchten Bereich hybridisieren und über eine Farbreaktion ermittelt werden.

Digoxigenin-markierte DNA-Sonden Die Digoxigenin-markierten Sonden wurden mit dem NEBlot-Kit (25) von New England Biolabs hergestellt. Die Durchführung entsprach den Angaben im Handbuch; der Ansatz musste nur bezüglich der eingesetzten Nukleotide von radioaktiver Markierung auf die Markierung mit DIG-dUTP abgewandelt werden. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die DIG-markierten Sonden 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend bis zur Hybridisierung auf Eis gestellt.

Restriktionshydrolyse, Agarosegelelektrophorese und Denaturierung der Nukleinsäuren Variierende Mengen an DNA (ca. 250 ng - 2 µg) wurden einer Restriktionshydrolyse unterzogen. Das Volumen der Restriktionsansätze betrug 20 µl. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für mindestens 2 Stunden meist jedoch über Nacht. Anschließend wurden die Ansätze in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid getrennt (1x-TBE-Laufpuffer bei 100 V). Zur Denaturierung der getrennten

DNA-Fragmente im Agarosegel wurde dieses zuerst 15 Minuten unter leichtem Schütteln in einer 0,25 M HCl-Lösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Gele 30 Minuten in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl-Lösung und zweimal 30 Minuten in 0,5 M Tris/HCl pH 7,5/3 M NaCl inkubiert.

Kapillar Blot Für den Blot wurde eine Lage Whatman-Papier (3MM) als Brücke über eine Glasplatte gelegt, wobei die Enden des Papiers in ein Reservoir mit 20x-SSC-Puffer eintauchten. Die Gele wurden direkt auf das Whatman-Papier gelegt. Die Ränder des Gels wurden mit Parafilm abgedichtet. Eine Nylon-Membran entsprechender Größe wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt und auf die Membran fünf zurechtgeschnittene Whatmann-Papiere, ein Stapel Papiertücher, eine Glasplatte und zuletzt ein Gewicht zum beschweren aufgelegt. Der Blot erfolgte über Nacht. Nach dem Blot wurde die DNA durch UV-Crosslinking an die Membran fixiert (3-minütige Bestrahlung mit UV-Licht).

Hybridisierung und Detektion der Sonde Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen mit Hybridisierungslösung (20 ml pro 100 cm² Membran) unter ständigem Schütteln eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der DIG-markierten Sonde in 5 ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen unter leichtem Schütteln der Membran. Die Membran wurde zweimal mit je 100 ml 2x-SSC-Puffer mit 0,1 % SDS für 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach zweimal für 15 Minuten mit 0,5x-SSC-Puffer mit 0,1 % SDS bei 65 °C gewaschen. Anschließend wurde die Membran eine Minute in 15 ml Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (v/v) Tween 20 equilibriert und 30 Minuten in 15 ml Blockierungslösung inkubiert. Es folgte eine weitere 30-minütige Inkubation in 20 ml Blockierungslösung mit 1 µl Antikörper gegen DIG. Danach wurde die Membran zweimal für 15 Minuten mit 100 ml Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20 bei RT gewaschen. Die Membran wurde 5 Minuten in 20 ml alkalischem Tris-Puffer equilibriert und zuletzt zur Detektion der Sonde 2 ml Färbe-Substratlösung (BCIP/NBT 1:50 verdünnt in alkalischem Tris-Puffer) direkt auf die Membran geben. Die Membran wurde dann für 1-2 Stunden dunkel und ohne Bewegung gelagert.

10x SB-Blockierungslösung: 1 % (w/v) Blocking Reagent (Roche) in Maleinsäurepuffer

Hybridisierungslösung: 5x-SSC-Puffer, N-Lauroylsarcosine 0,1 % (w/v), SDS 0,02 % (w/v), 10x SB-Blockierungslösung 10 % (v/v)

20x-SSC-Puffer: NaCl 3 M, Na-Citrat 0,3 M, pH 7,0

Maleinsäurepuffer: NaCl 150 mM, Maleinsäure 100 mM, pH 7,5

alkalischer Tris-Puffer: NaCl 100 mM, Tris 100 mM, pH 9,5

EMSA

DNA-Matrizen für EMSA Die DNA-Sequenzen für die EMSA-Gelretardierungsexperimente wurden über PCRs amplifiziert. Hierfür wurden die Promotorbereiche der zu untersuchenden Gene mit der Phusion Polymerase von New England Biolabs nach beschriebenem Standard-Protokoll angereichert (vgl. Seite ii). Als Matrize wurde genomische DNA aus *P. furiosus* verwendet; die eingesetzten Oligonukleotide, welche paarweise eine 5'-FAM- oder -HEX-Markierung enthielten sind unten gelistet. Für die Amplifikation des *gdh*-Promotors wurde das Plasmid pMUR8 verwendet und die entsprechende Region mit M13 (M13F und M13R-Cy5)-Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit einem 1%igen Agarosegel analysiert, mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega gereinigt und die Konzentration der DNA-Lösung mit dem NanoDrop ND-1000 bestimmt.

Liste der für EMSA-Matrizen verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
PF0496-200-F	5'- GGGACAGTTGTTTATTACTTTACC -3'
0496+110-FAM-R	5'- TCTGCTGGAGTAAGAACACCAA -3'
PF0073-110F	5'- ATTGAGCCTCCTCAAAAAGCAA -3'
PF0073/0074-FAM	5'- GGAAACCAGACCAAGAATATCCA -3'
PF1547-200-F	5'- AATCGATAGTTCCGTCTTTCCTC -3'
PF1547+100-R-FAM	5'- CCTTTATCTCTTCAATAACGAC -3'

DNA-Bindestudien Es wurden 'electrophoretic mobility shift assays' durchgeführt, um die Fähigkeit von TrmBL2, an verschiedene DNA-Sequenzen zu binden, zu untersuchen. Daher wurden für diese Studien wie im entsprechenden Kapitel angegeben sowohl die verwendeten Sequenzbereiche als auch TrmBL2-Proteinkonzentrationen variiert. Für die Bindereaktion von TrmBL2 wurden je 20 nM fluoreszenz-markierte DNA und etwa 14 U Heparin als unspezifischer Kompetitor eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl in EMSA-Pufferlösung angesetzt. Die DNA-Protein-Komplexe wurden 10 Minuten bei 70 °C inkubiert (Mastercycler personal, Eppendorf) und anschließend auf einem 6%igen nativen Polyacrylamidgel analysiert (MiniProtean, BioRad). Nach einer Elektrophorese bei 200 V für 20 bis 40 Minuten (ca. 40 °C) erfolgte die Auswertung über die fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente am Fluoreszenzimager (FLA-5000, Fuji, Japan).

EMSA-Puffer: Na-HEPES pH 7,5 40 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1 mg/ml, Glycerol 8 % (v/v)

10x-TBE: Tris 900 mM, Borsäure 900 mM, EDTA 20 mM

PA-Gel 6 %: H₂O 13,4 ml, 10x-TBE 2 ml, Rotiphorese Gel 30 4 ml, Glycerin 0,4 ml, APS (10 %) 0,2 ml, TEMED 20 μ l

EMSA-Laufpuffer: 1x-TBE, Glycerol 4 %

***in vitro* Transkription**

DNA-Matrizen für die *in vitro* Transkription Für die *in vitro* Transkription wurde PCR-amplifizierte DNA, welche die Promotorsequenz der zu untersuchenden Gene enthielt, eingesetzt. Die PCR wurde mit der Phusion DNA Polymerase nach dem Protokoll des Herstellers (New England Biolabs) für Standard-PCRs durchgeführt (vgl. Seite ii). Für die Amplifikation des *gdh*-Promotors wurde das Plasmid pUC19/*gdh* verwendet und die entsprechende Region mit M13 Primern amplifiziert. Für davon abweichende DNA-Matrizen wurde genomische DNA von *P. furiosus* in die PCR eingesetzt (die Primer für die Amplifikation sind in den jeweiligen Kapiteln genannt). Die PCR-Produkte wurden mit einem 1%igen Ethidiumbromid-Agarosegel analysiert, mit dem 'Wizard SV Gel and PCR Clean-Up' System von Promega gereinigt und die Konzentration der DNA-Lösung mit dem NanoDrop ND-1000 bestimmt.

Promotor-abhängige run-off *in vitro* Transkription Standard run-off-Transkriptionsreaktionen wurden mittels zellfreiem Transkriptionssystem für *P. furiosus* nach Hethke [Hethke *et al.*, 1996] durchgeführt. Die Ansätze beinhalten in einem Gesamtvolumen von 25 μ l 20 ng ds-Matrizen-DNA (*gdh*-Promotorsequenz, 412 bp, 3 nM), 5 nM RNAP, 30 nM TFB und 95 nM TBP. ATP, GTP und CTP wurden in einer Konzentration von 40 μ M sowie UTP mit 2 μ M und radioaktiv-markiertes [α -³²P]-UTP mit 0,15 MBq (110 TBq/mmol) eingesetzt. Die Komponenten wurden bei 4 °C vereinigt und die finalen Ansätze 10 Minuten bei 80 °C in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) inkubiert. Die RNA wurde über Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt und gewaschen. Die in Tris-EDTA-Puffer resuspendierte Probe wurde mit Formamidauftragspuffer versetzt und 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die markierte RNA wurde elektrophoretisch in 6 % (w/v) Polyacrylamid-Harnstoffgelen getrennt. Die Transkripte wurden über die Belichtung von Imaging Plates (BASF) und mit Hilfe eines Phosphoimagers (FLA-5000, Fuji, Japan) ausgewertet.

Tris-EDTA-Puffer (10:0,1): Tris pH 8,0 10 mM, EDTA 0,1 mM

Transkriptionspuffer: Na-HEPES, pH 7,3 40 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Glycerin 5 % (v/v), EDTA 0,1 mM, BSA 0,1 mg/ml

Formamidauftragspuffer: Formamid 98 %, Bromphenolblau 0.1 %, Xylencyanol 0.1 %, EDTA pH 8.0 10 mM

1.2. Proteinbiochemische Verfahren

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteinfärbung

Um Proteine elektrophoretisch nach ihrer Masse zu trennen, wurde die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Lämmli [Laemmli *et al.*, 1970]. Es wurden 8-15%ige Trenngele oder 10-20 % Gradientengele und 4%ige Sammelgele verwendet, welche nach angegebener Tabelle erstellt wurden. Die Proteinlösungen wurden mit entsprechenden Volumen des fünf-fach konzentrierten Ladepuffers versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelkammern (Miniprotean, Bio-Rad, München) in 1x SDS-Laufpuffer mit den empfohlenen Bedingungen (konstante Spannung von 200 V).

	Sammelgel 4 %	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Trenngel 20 %
30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid (ml)	0,44	2,7	3,3	4,5	6,7
Upper Tris (ml)	1,0				
Lower Tris (ml)		2,5	2,5	2,5	2,5
H ₂ O _{bidest.} (ml)	2,6	4,8	4,2	3,0	0,7
10 % APS (μl)	40	100	100	100	100
TEMED (μl)	6	10	10	10	10

Upper Tris: Tris/HCl pH 6,8 0,5 M, SDS 0,4 %

Lower Tris: Tris/HCl pH 8,8 1,5 M, SDS 0,4 %S

5x Auftragspuffer: Tris/HCl pH 6,8 320 mM, SDS 480 mM, Glycerin 20 mM, β-Mercaptoethanol 0,36 mM, Bromphenolblau pH 6,8 14,4 mM

1x SDS-Laufpuffer: Tris/HCl pH 8,0 25 mM, Glycin 192 mM, SDS 1 % (w/v)

Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie-Blau [Meyer und Lamberts, 1965] oder Silbernitrat [Blum *et al.*, 1987] gefärbt. Bei der Coomassiefärbung wurde das SDS-PA-Gel mindestens 30 Minuten in Coomassie-Blau-Färbelösung (10 % Essigsäure, 0,006 % Coomassie Blue R-250) geschwenkt und danach wiederholt mit Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 30 % Ethanol) behandelt. Für die Silberfärbung wurden die Polyacrylamidgele für mindestens eine Stunde in Fixierlösung geschwenkt. Es folgte je ein 10-minütiger Waschschriff mit 50%igem und anschließend 10%igem Ethanol. Anschließend wurde das Gel für eine Minute in Thiosulfatlösung blockiert und nachfolgend dreimal mit H₂O_{bidest.} für eine Minute gewaschen. Das Gel wurde 40 Minuten mit Silbernitrat gefärbt und anschließend erneut dreimal in H₂O_{bidest.} für je eine Minute gewaschen. Anschließend wurde dem Gel eine Entwicklungslösung zugegeben und bei deutlicher Färbung der Proteine die Reaktion mit Stopplösung beendet.

Fixierlösung: Methanol 50 %, Essigsäure 10 %

Thiosulfatlösung: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ 20 mg, $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ ad 90 ml

Silbernitrat-Lösung: AgNO_3 100 mg, Formaldehyd (37 %) 75 μl , $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ ad 100 ml

Entwicklungslösung: $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ 18 g, Thiosulfatlösung 4 ml, Formaldehyd (37 %) 50 μl , $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ ad 100 ml

Stopplösung: Essigsäure 20 %

Rohextrakt-Herstellung bei *P. furiosus*

Um das Proteom von genomisch veränderten *P. furiosus*-Stämmen zu analysieren oder Proteine aus diesen zu reinigen, wurden Zelllysate der entsprechenden Zellen erstellt. Das Zellmaterial von *P. furiosus* wurde in etwa 2 ml geeignetem Aufschlusspuffer (etwa PBS, TNE oder Proteinpuffer) pro Gramm Zellpellet gelöst bzw. zerkleinert. Anschließend wurden die Ansätze je 3-mal für 30 Sekunden sonifiziert (Branson Sonifier). Es wurden Glaspartikel (etwa 10 % (v/v); Ø 0,17-0,18 mm) beigelegt und die Zellen 4-mal für 20 Sekunden in der Kugelmühle (FastPrep-24, M.P. Biomedicals, Irvine, CA) bei 6,0 M/s aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 4.500 rpm (50 ml Tubes, Heraeus Zentrifuge, 4 °C) für 15 Minuten wurden die Glasperlen und große Zellreste entfernt. Bei einem ausgeprägten Rest-Pellet wurden die Zellreste erneut mit Aufschlusspuffer versetzt und die beschriebenen Prozeduren ein zweites Mal durchgeführt. Der gesamte Überstand wurde mit RNase A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und DNase (1 U/ml) versetzt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Bei großen Volumen wurde der Überstand anschließend eine Stunde bei 100.000 g zentrifugiert (Beckmann LE-80K UZ, 4 °C, 39.000 rpm). Kleine Volumen wurden 30 Minuten bei 4 °C bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand steril filtriert (0,45 μm) und bei -80 °C gelagert.

PBS: NaCl 137, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM

TNE: Tris/HCl, pH 8,0 100 mM, NaCl 50 mM, EDTA 50 mM

Proteinpuffer: Na-HEPES pH 7,3 40 mM, KCl 250 mM, MgCl_2 2,5 mM, EDTA 0,1 mM, Glycerin 20 % (v/v)

Western Blot (WB)

Zur immunologischen Analyse von Proteinen wurden diese zunächst durch SDS-PAGE getrennt. Es wurde dazu ein vorgefärbter Größenstandard verwendet, welcher direkt nach dem Transfer auf die Membran sichtbar bleibt (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Nach der Elektrophorese wurde das Gel und in der Größe entsprechend zurechtgeschnittene Whatman-Papiere (2-4 Lagen) (3MM-Whatman; Whatman, Maldstone, GB) sowie die Fiber Pads der Wet Blot-Anlage (Miniprotan, Bio-Rad, München) für 15-20 Minuten in Tobwin-Puffer [Tobwin *et al.*, 1970] äquilibriert. Gleichfalls wurde auch eine zurechtgeschnittene PVDF-Membran (0,2 μm ; Millipore) nach der Aktivierung mit (technischem) Methanol in Tobwin-Puffer äquilibriert. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die Fiber Pads, die Filterpapiere, das Gel und die Membran luftblasenfrei in den Blotting-Kassetten zusammengesetzt. Der Transfer erfolgte in vorgekühltem

Tobwin-Puffer und mit Kühlakku (-20 °C) für eine Stunde (100 V, 350 mA) oder ohne vorgekühlten Puffer und Kühlakku über Nacht (30 V, 90 mA) bei 6-8 °C.

Tobwin-Puffer: Methanol 20 % , Tris 25 mM, Glycin 192 mM

Anschließend wurde die Membran eine Stunde lang in WB-Blockierungslösung inkubiert und danach für eine weitere Stunde mit primärem Antikörper, welcher in Blockierungslösung auf ein bestimmtes Verhältnis verdünnt wurde, behandelt. Die Membran wurde 3-mal für 10-15 Minuten in 1x TBST-Puffer gewaschen und dann erneut für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (in Blockierungslösung 1:15.000 verdünnt) inkubiert. Zuletzt wurde die Membran wiederum dreimal für je 10-15 Minuten mit 1x TBST gewaschen und danach mit dem Fuji FLA-5000 Imager bei 635 nm ausgelesen. Bei Bedarf konnte die Membran gestrippt (20-minütige Inkubation in 0,5 M NaOH) und mit alternativen Antikörpern hybridisiert werden.

10x-TBS: Tris/HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 1500 mM

TBST-Puffer: 1x-TBS, Tween20 0,1 % (v/v)

WB-Blockierungslösung: 5 % (w/v) Natrium-Casein in TBST-Puffer

Antikörper	Typ	Abstammung	Hersteller
Anti-RpoD	primär	Kaninchen	Davids Biotechnologie
Anti-RpoA”	primär	Kaninchen	Davids Biotechnologie
Anti-TrmBL2	primär	Kaninchen	Davids Biotechnologie
Anti-GDH	primär	Kaninchen	Davids Biotechnologie
Anti-TrmBL2	primär	Kaninchen	Davids Biotechnologie
Anti-TBP	primär	Kaninchen	Davids Biotechnologie
Anti-Rabbit Dylight 649	IgG, sekundär	Ziege	Thermo Scientific

Chromatografische Verfahren

Die Aufreinigungen wurden mit dem System AEKTA purifier 12 von GE Healthcare (Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Ni-NTA-Chromatografie Die in *P. furiosus* gezielt veränderten Proteine wurden zur vereinfachten Reinigung mit Hexahistidin-Proteintags versehen. Zur Reinigung dieser Proteine wurden die erstellten Rohextrakte der *P. furiosus*-Expressionsstämme anschließend auf eine Ni-NTA-Säule (His Trap HP 1 ml, GE Healthcare, Uppsala) aufgetragen (Flussrate: 0,5 ml/min), die zuvor mit dem verwendeten Aufschluss-Puffer der Zellen equilibriert wurde. Die durch Nitrilotriessigsäure-

reste an der Säulenmatrix immobilisierten Ni^{2+} -Ionen reagieren mit den Hexahistidin-Proteintags der zu reinigenden Proteine und binden diese. Durch fortgesetztes Spülen der Säule mit dem Aufschlusspuffer wurden Proteine, die nicht an das Säulenmaterial gebunden hatten, entfernt. Es wurde so lange mit dem Auftragspuffer gewaschen bis die Absorption konstant blieb. Anschließend wurden die Proteine mit Hochsalzpuffer von der Säule eluiert. Da Imidazol mit dem Protein um die Bindung an die Ni^{2+} -Ionen der Matrix konkurriert, was zur Freisetzung des Proteins führt, wird es zur Elution eingesetzt. Es wurden 10 Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und mittels SDS-PAGE auf Gehalt und Reinheit des Zielproteins untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden je nach Bedarf vereinigt und das Volumen der Lösung danach wiederum mittels Konzentratoren (Vivaspin20, MWCO 30.000, Sartorius) erniedrigt. Dazu wurde die vereinigte Proteinlösung so lange in den Konzentratoren zentrifugiert (Heraeus Zentrifuge, 4.500 rpm) bis das Volumen der Lösung auf 2-3 ml eingeeengt war.

Aufschluss-Puffer: Na-HEPES pH 7,5 40 mM, NaCl 1 M, MgCl_2 2,5 mM, Glycerin 20 % (v/v), Imidazol 20 mM

Hochsalzpuffer: Na-HEPES pH 7,5 40 mM, NaCl 1 M, MgCl_2 2,5 mM, Glycerin 20% (v/v) , Imidazol 500 mM

(Alle verwendeten ÄKTA-Puffer wurden vor Gebrauch entgast und steril filtriert; Porengröße des Filters: 0,45 μm)

Gelfiltrations-Chromatografie Für analytische Gelfiltrationen oder zur weiteren Reinigung und Entsalzung der durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinlösungen wurden Gelfiltrationen mit einer Superdex 200 prep grade (16/60)-Säule mit einem Bettvolumen von 120 ml (GE Healthcare, Uppsala) durchgeführt. Die Säulenpuffer wurden vor Gebrauch filtriert (ME 25 Membranfilter, Cellulosemischester, 0,45 μm , Whatman, Dassel), entgast und die Säule mit 3-5 Säulenvolumen des Proteinpuffers equilibriert. Die Proteinlösungen wurden mit einem maximalen Volumen von 2 % des Bettvolumens der Säule injiziert. Die Elution erfolgte mit Proteinpuffer und einer konstanten Flussrate von 0,5 ml pro Minuten über 1,5 Säulenvolumen. Die Fraktionsgröße betrug je 2 ml. Die anschließende Reinigung und Lagerung der Säule erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Proteine wurden durch Messung der Absorption (280 nm) nachgewiesen und fraktioniert gesammelt. Proben der Fraktionen, welche entsprechend ihrer Absorption und ihres Elutionsvolumens das gewünschte Protein enthielten, wurden anschließend gelelektrophoretisch über SDS-PAGE getrennt und untersucht. Die Fraktionen mit dem Zielprotein wurden je nach Bedarf vereinigt und das Volumen danach mittels Konzentratoren (Vivaspin20, MWCO 30.000, Sartorius) und Zentrifugation (4.500 rpm) erniedrigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration und Ausbeute der Reinigung wurde die Proteinlösung aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Proteinpuffer: Na-HEPES pH 7,3 40 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 2,5 mM, Glycerin 20 % (v/v)

1.3. Organismische Methoden

Kultivierung von *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurde Luria-Bertani (LB)-Medium [Sambrook *et al.*, 1989] verwendet. Die Flüssigmedien wurden in geeigneten Volumina und Gefäßen jeweils 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Bei der Verwendung plasmidhaltiger Stämme wurde dem Medium bzw. den Platten je nach Bedarf vor dem Gebrauch Ampicillin (100 mg/l), Kanamycin (50 mg/l) oder Chloramphenicol (25 mg/l) oder Kombinationen dieser Antibiotika zugesetzt. Alle *E. coli*-Kulturen wurden aerob bei 37 °C angezogen. Zur Vereinzelung wurden die Zellen auf festem LB-Agar-Nährboden plattiert. Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium oder in 1-l-Schüttelkolben mit 250 ml Medium. Die Kulturen wurden auf einem Schüttler (etwa 150 Upm) oder in einem Roller (Rollodrum, Brunswick) inkubiert. Bei Nutzung von lac-Promotoren in Expressionsansätzen wurde der *E. coli*-BL21-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase (OD 578 nm = 0,5 - 0,8) IPTG (EK 1 mM) zugegeben, um die Expression des Proteins zu induzieren.

LB-Medium: Bacto-Trypton 10 g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 5 g, H₂O_{bidest.} ad 1000 ml, pH 7,5

LB-Amp-Agarplatten: Bacto-Trypton 10 g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 5 g, Agar 18 g, H₂O_{bidest.} ad 1000 ml, pH 7,5

Kultivierung von *P. furiosus* in kleinem Maßstab

Die verwendeten Medien für die Kultivierung von *P. furiosus* basieren auf den Komponenten von synthetischem Meerwasser [Fiala und Stetter, 1986]. Die Bestandteile der entsprechenden Medien und Zusätze wurden zunächst alle (außer Na₂S) in H₂O_{bidest.} gelöst, in eine 1-L-Duranglasflasche gefüllt und mit einem Gummistopfen und einer durchbohrten Schraubkappe (Schott GL 45) verschlossen. Das Medium wurde für 30 Minuten mit N₂ durchgast und anschließend durch Zugabe des Reduktionsmittels Na₂S der noch verbliebene Sauerstoff entfernt. Nach eventueller Korrektur des pH-Wertes (Sollwert 6,5 -7,0) wurden die Kulturmedien in der Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Arbor, USA) in Volumen von 20 bis 250 ml gefüllt. Hierfür wurden 120-ml-Serumflaschen (Natronkalk-Silikat-Glas, Stute GmbH, Rheinbreitbach) oder 1-l-Druckflaschen (Borsilikatglas, Müller und Krempel AG, Büllach, Schweiz) verwendet. Final wurden die Serum- bzw. Druckflaschen an der Gasstation je dreimal evakuiert und N₂ mit 2 bar (Serumflaschen) bzw. 1,5 bar (Druckflaschen) aufgepresst. Die Kulturmedien wurden für 20 Minuten bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert.

Im Gegensatz zur Herstellung der Flüssigmedien wurde bei Gelrite-Platten kein Resazurin eingesetzt, alle weiteren Bestandteile wurden identisch verwendet und Gelrite (1,5 % w/v) beigelegt. Nach Gaswechsel, Reduktion mit Na₂S und pH-Kontrolle wird die Suspension für die Gelrite-Platten in Druckflaschen autoklaviert. Das gelöste Gelrite wurde heiß teilentgast und in die Anaerobenkammer eingeschleußt. Dort umgehend wird es kurz gerührt und zügig in anaerobe Petrischalen gegossen (Volumen ca. 30 ml) werden. Die Gelrite-Platten werden bis zur Verwendung in

der Anaerobenkammer gelagert.

SME		Mineralelexir 10x	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
NaCl	473,99 mM	NaCl	171,10 mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	28,4 mM	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	121,70 mM
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	27,1 mM	MnSO ₄ × H ₂ O	29,60 mM
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	5,1 mM	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	6,80 mM
KCl	8,7 mM	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	3,60 mM
NaBr	0,97 mM	CoSO ₄ × 7 H ₂ O	6,40 mM
H ₃ BO ₃	0,49 mM	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	6,30 mM
SrCl ₂ × 6 H ₂ O	0,056 mM	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,40 mM
KJ-Lsg., 0,05%ig	0,30 µM	KAl(SO ₄) ₂ × 12 H ₂ O	0,38 mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml	H ₃ BO ₃	1,63 mM
		Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,41 mM
		(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ × 6 H ₂ O	7,09 mM
		Na ₂ SeO ₄	0,53 mM
		Na ₂ WO ₄ × 2 H ₂ O	0,30 mM
		H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml, pH 1,0

$\frac{1}{2}$ SME- Medium		Zusätze	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
SME	500 ml	Hefeextrakt	0,25 - 0,1 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 g	Pepton	0,1 % (w/v)
Na ₂ S × 3 H ₂ O	0,3 g	Stärke	0,1 % (w/v)
Wolfe's Mineralien (10x, pH 1,0)	1,0 ml	Na-Pyruvat	0,2 - 0,4 % (w/v)
Resazurin (0,1 %)	1 ml		
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml		

Die Zugabe von Simvastatin oder 6-Methylpurin zu Flüssigmedien oder Gelrite-Platten erfolgte direkt vor der Verwendung des Mediums. Die Inkubation der Kulturen fand in der Regel bei 85 °C bis 95 °C statt; die Vorkulturen für die Transformation wuchsen bei 75 °C in Thermoinkuba-

toren. Die Gelrite Platten wurden bei 85 °C entweder in gasdichten Behältern in einem Inkubator innerhalb der Anaerobenkammer oder in N₂-begasten Anaerobentöpfen in Thermoinkubatoren außerhalb der Anaerobenkammer inkubiert.

Kultivierung von *P. furiosus* in Biofermentationsanlagen

Für die Kultivierung von *P. furiosus* im Großmaßstab wurden Fermenter (HTE, Bioengineering, Wald, Schweiz) mit 15 bis 100 l Gesamtvolumen verwendet. Die Medienbestandteile, Salze und gegebenenfalls Stärke wurden für das benötigte Volumen an Medium eingewogen, im Fermenter mit H₂O_{bidest.} gelöst und für 40 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nachfolgend wurden dem Medium die entsprechenden organischen Zusätze und Na₂S zugegeben sowie der pH mit 5 M NaOH auf etwa 6,5 eingestellt. Hefeextrakt und Pepton sowie Na₂S waren zuvor getrennt eingewogen, in H₂O_{bidest.} gelöst und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert worden. Das Medium wurde mit der entsprechenden Menge (abhängig vom Medium zwischen 50 und 500 ml) an Vorkultur (Zelldichte 1,0 - 2,5*10⁸) inokuliert. Die Großanzucht von *P. furiosus* erfolgte anaerob unter einer N₂-Gasphase (2 bar Überdruck) bei 85-95 °C für 16 bis 40 Stunden. Die Zellen wurden unter konstantem Rühren (250 rpm) bis zur spät-exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Anschließend wurde die Zellanzucht durch Kühlen auf 4-20 °C beendet. Danach wurden die Zellen mit einer Durchlaufzentrifuge (Typ CEPA Z41G, Padberg, Lahr) geerntet (Durchlaufgeschwindigkeit von 8-10 l/h), in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Zellausbeute betrug je zwischen 0,5-2 g/l.

Formaldehydfixierung

Um die Zellkomponenten während des Wachstums unter bestimmten Bedingungen zu fixieren, wurden den Kulturen in den Biofermentationsanlagen (15 Liter, 95 °C) bei einer Zelldichte von etwas 1,5*10⁸/ml 33 ml 37%iges Formaldehyd beigesetzt (EK 0,1 %). Die Vernetzungsreaktion wurde nach 20 Sekunden durch die Beigabe von 66 ml 2,5 M Glycin gestoppt. Wie früher beschrieben, wurden die Kulturen gekühlt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -80 °C gelagert. Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise ist in der Dissertation von Gudrun Vierke [Vierke, 2007] bzw. Robert Reichelt beschrieben.

Substanz	Menge-15-Liter-Fermenter	Menge-50-Liter-Fermenter	Menge-100-Liter-Fermenter
NaCl	425 g	1250 g	2500 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	59,5 g	175 g	350 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	46,75 g	137,5 g	275 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	6,4 g	18,75 g	37,5 g
KCl	5,5 g	16,25 g	32,5 g
NaBr	0,85 g	2,5 g	5,0 g
H ₃ BO ₃	0,26 g	0,75 g	1,5 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,13 g	0,38 g	0,75 g
KJ-Lsg., 0,05%ig	0,85 ml	2,5 ml	5 ml
KH ₂ PO ₄	8,5 g	25,0 g	50,0 g
K ₂ HPO ₄	18,0 g	53,0 g	106,0 g
Mineralelexier (Wolfe, 10x)	17 ml	50 ml	100 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 17 L	50 L	100 l
Stärke	15 g	50 g	100 g
Hefeextrakt	3,75 - 15 g	12,5 - 50 g	25 - 100 g
Pepton	15 g	50 g	100 g
NaOH (5N)	9,0 ml	30 ml	60 ml
Na ₂ S x 3 H ₂ O	4,35 g	14,9 g	29,7 g

Hitzeschock-Transformation bei *P. furiosus*

Für die Transformation wurden Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase ($1,0 \cdot 10^8$ Zellen/ml) verwendet. In der Anaerobenkammer wurden pro Transformationsansatz 3 ml der Kultur entnommen, auf zwei Reaktionsgefäße mit 1,5 ml aufgeteilt und zentrifugiert (10 min bei 6.000x g). Die Zellpellets aus je zwei Reaktionsgefäßen wurden in insgesamt 0,1 ml Transformationspuffer resuspendiert und in ein 0,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Im Thermocycler (Mastecycler personal, Eppendorf) wurden die Zellen in der Anaerobenkammer für 1,5 Stunden bei 4 °C inkubiert, wobei nach 30 Minuten je die zu transformierende DNA zugegeben wurde. Im Anschluss erfolgte der Hitzeschock für 3 Minuten bei 80 °C. Zuletzt wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 4 °C gekühlt. Mit den Transformationsansätzen wurden selektive $\frac{1}{2}$ SME-Medien mit je 0,1 % Hefeextrakt, Stärke und Pepton sowie 10 μ M Simvastatin angeimpft; die Inkubation nach der Transformation erfolgt stets bei 85 °C. Nach wiederholter Überimpfung der Transformationsansätze wurden diese auf $\frac{1}{2}$ SME- (je 0,1 % Hefeextrakt, Stärke und Pepton, 10 μ M Simvastatin)-Gelrite Platten plattiert

und bei 85 °C in einem gasdichten Behälter inkubiert. Aus *P. furiosus*-Einzelkolonien wurden Rein-
kulturen in Flüssigmedium ($\frac{1}{2}$ SME, 0,1 % Hefeextrakt, Stärke, Pepton, und 10 μ M Simvastatin)
hergestellt.

Transformationspuffer: Na-Pyruvat 40 mM, NH₄Cl 4,67 mM, CaCl₂ × 2 H₂O 80 mM, $\frac{1}{2}$ SME, pH
7,0

Simvastatin: MW = 418,57 g/mol; Endkonzentration 1 mM: 42 mg in 100 ml EtOH; Steril-Filtration
(Porengröße 0,2 μ m) und Aufbewahrung in N₂-begaster Serumflasche bei -20 °C

1.4. Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Bacto Pepton	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Roche, Mannheim
Chloroform/ Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich, Seelze
DNA-Marker	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
dNTPs	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehydlösung (37 %)	Merk, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, Seelze
Glycerol	Sigma-Aldrich, Seelze
Glykogen	Ambion, St. Austin (USA)
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, St. Louis (USA)

Isotope (γ - ^{32}P)-ATP; (α - ^{32}P)-UTP	Hartmann Analytik, Braunschweig
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NTPs	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Nylonmembran	Roche, Mannheim
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
PEG	Sigma-Aldrich, Seelze
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Rnase Zap	Ambion, St. Austin (USA)
Rotiphorese Gel 30+40	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	USB, Cleveland (USA)
Whatman-Papier	3MM, Maidstone (GB)
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Seelze

Der Reinheitsgrad der Chemikalien war in der Regel p.a. (pro analysi). Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (St. Luis, USA) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

1.5. Enzyme, Standards, Kits

Chemikalien	Bezugsquelle
<i>Acc65I</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>AscI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>BamHI</i>	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>BglII</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>BstXI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>EagI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>NaeI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>NcoI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>NotI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>SacI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>ScaI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>SbfI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up	Promega, Mannheim
Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification	Promega, Mannheim

2. Abkürzungen

2.1. Allgemeine Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumperoxiddisulfat

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRE	Factor B Recognition Element
BSA	Bovines Serumalbumin
Bq	Becquerel
C	Cytosin
ChBD	Chitinbindedomäne
CI	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
CoA	Coenzym A
CTD	C-terminale Domäne (von Rpb5)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Di-Desoxynukleotidtriphosphat
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	Entner-Doudoroff-Weg
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EM	Emden-Meyerhof-Weg
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
<i>et al.</i>	Et alii
5'-FOA	5-Fluororotsäure
G	Guanosin
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GMP	Guanosinmonophosphat
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
GTP	Guanosintriphosphat
H	Stunde

2. Abkürzungen

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HMGCR	HMG-CoA-Reduktase
H-NS	Histone-Like Nucleoid Structuring Protein
HTH	Helix turn helix
IHF	integration host factor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	kilo
LB	Luria-Bertani
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LrpA	Leucine-responsive regulatory protein A
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie
min	Minute
MP(S)	Magnetpartikel(separator)
mRNA	Messenger RNA
MW	Molecular Weight
NAZ	Nukleotid-Additions-Zyklus
NaAc	Natriumacetat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
Nt	Nukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ORF	Open reading frame
PA	Polyacrylamid
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration

Phr	<i>Pyrococcus</i> heatshock regulator
pI	Isoelektrischer Punkt
PIC	Präinitiationskomplex
PNK	Polynukleotidkinase
Pol I-III	eukaryotische RNA-Polymerase I-III
PVDF	Polyvenyліденfluorid
RMA	Robust Multichip Averaging
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Signalpeptidsequenz
SSC	saline sodium citrate
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TE	10 mM Tris, 0,1 mM EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
TFE	Transkriptionsfaktor E
TGM	Thermococcales glycolytic motif
TL	Trigger Loop
TrmB	Transcriptional regulator of the maltose system B
TTP	Thymin Triphosphat
U	Units
UTP	Uridin Triphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Prozentsatz Volumen zu Volumen

VSN	Varianz-stabilisierende Normalisierung
w/v	Prozentsatz Gewicht zu Volumen
wt	Wildtyp
XMP	Xanthosinmonophosphat
z.B.	zum Beispiel

2.2. Buchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

1.1. Auszüge der Uracil <i>de novo</i> Synthese und die 5'-FOA Selektion	4
1.2. Schematischer Überblick der single Crossing-over Strategie zur markerlosen Deletion von Genen	8
1.3. Der modifizierte Embden-Meyerhof-Weg in Archaea	12
1.4. Schematische Übersicht der Transkriptionsinitiation	15
1.5. Übersicht der Gesamtstruktur von RNAPs aus den drei Domänen	18
1.6. RNAP Untereinheiten in den drei Domänen des Lebens	19
2.1. Schematische Darstellung des Mevalonat Stoffwechsels der <i>Thermococcales</i>	22
2.2. Der Shuttle Vektor pYS3	23
2.3. Trigger Loop	24
2.4. Schematische Darstellung der Trigger Loop Dynamik in bestimmten Phasen der Transkription	25
2.5. Konstruktion des Plasmids pYS7 (pMUR46)	29
2.6. pYS7-Derivate, Konstruktion der Plasmide pMUR64 und pMUR66	29
2.7. Überblick der modifizierten RpoA"-Varianten	35
2.8. SDS-Gel mit den gereinigten RpoA"-RNAPs	37
2.9. Die gereinigten RpoA"-RNAPs sind frei von Kontamination durch wt RNAP	37
2.10. Rekrutierung der mutierten RpoA"-RNAPs an den <i>gdh</i> -Promotor	38
2.11. Fähigkeit der mutierten RpoA"-RNAPs zur Open-Complex-Bildung	39
2.12. Stark verminderte RNA-Syntheseleistung der modifizierten RpoA"-RNAPs bei <i>in vitro</i> Transkriptionsexperimenten	40
2.13. Signifikanter Unterschied des Gehalts an Wildtyp und modifizierter RpoA"-Untereinheit in den <i>P. furiosus</i> Stämmen	41
2.14. Unterschiede im Proteom der <i>P. furiosus</i> -Stämme	42
2.15. DNA-Matrize mit <i>pf0739</i> und <i>pf0740</i> Promotorelementen.	44
2.16. Einfluss von PF0739 auf promotorabhängige <i>in vitro</i> Transkriptionen	45
2.17. Bindeaktivitäten von PF0739 an <i>pf0739</i> - und <i>pf0740</i> -Promotorsequenzen	45
2.18. DNase-Footprinting mit PF0739 und TBP/TFB an der <i>pf0739/pf0740</i> -Promotorsequenz	47
3.1. Multiples Sequenz-Alignment von TrmB, TrmBL1 und TrmBL2 aus <i>P. furiosus</i>	57
3.2. Konstruktion des Plasmids pMUR61	60
3.3. DNA-Konstrukt zur Erzeugung von MURPf10.	60
3.4. Schematischer Überblick der Microarray mRNA-Profilng Technologie.	62
3.5. Normalisierung der Array-Rohdaten dargestellt in Boxplots	63

3.6. Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit der Microarray-Replikate	64
3.7. Hierarchisches Cluster der verschiedenen stark exprimierten Gene in <i>P. furiosus</i> Wild- typ und der TrmBL2-Deletionsmutante	65
3.8. Strategie zur Erzeugung von <i>P. furiosus</i> MURPf6 und MURPf10.	70
3.9. Verifizierung der TrmBL2-Deletionsmutante durch Southern Blot	71
3.10. Das Expressionsniveau von TrmBL2 ist nur geringfügig abhängig vom Substrat der Zellen	72
3.11. Vergleich des Wachstums von <i>P. furiosus</i> Wildtyp und TrmBL2-Deletionsmutante auf verschiedenen Substraten	73
3.12. Chip-seq-ermittelte Bindestellen von TrmBL2	76
3.13. DNA-Bindeaktivität von TrmBL2 in Gelretardierungs-Elektrophoreticmobility-Shift Assays.	78
3.14. Autoregulatorischer Einfluss von TrmBL2 bei <i>in vitro</i> Transkriptionsassays mit der Promotorsequenz von <i>pf0496</i> als DNA-Matrize.	79
3.15. Kombinierte <i>in vitro</i> Transkription mit den Promotorsequenzen des <i>gdh</i> -Gens und des <i>trmBL2</i> -Gens als DNA-Matrizen.	80
3.16. Größenausschluß-Chromatographie von TrmBL2 _{His6} an einer kalibrierten Super- dex 200 16/60 HiLoad Säule.	81
3.17. Vergleich des Wachstums von <i>P. furiosus</i> Wildtyp und TrmBL2-Deletionsmutante unter Hitzeschock-Bedingungen und konstanter Wachstumstemperatur	82
3.18. Der Gehalt von TrmBL2 in den <i>P. furiosus</i> -Zellen bleibt auch bei erhöhter Tempera- tur konstant.	83
3.19. Hitzestabilität von TrmBL2	84
4.1. Superpositionierung von RpoH und Rpb5	90
4.2. Konstruktion der Plasmide pMUR27 und pMUR28	96
4.3. Konstruktion der Plasmide pMUR43 und pMUR54	97
4.4. Strategie zur Erzeugung von <i>P. furiosus</i> MURPf38 und MURPf39	99
4.5. Wachstumsverhalten von <i>P. furiosus</i> MURPf38 und MURPf39	100
4.6. Unveränderte RNA-Syntheseleistung der modifizierten RpoH-RNAPs bei <i>in vitro</i> Transkriptionsexperimenten	101
4.7. Sequenzalignment von RpoH	103
5.1. Vergleich der Chitinasen aus <i>T. kodakarensis</i> und <i>P. furiosus</i>	107
5.2. Konstruktion des Plasmids pMUR35	114
5.3. Konstruktion des Plasmids pMUR37	115
5.4. Konstruktion des Plasmids pMUR47	116
5.5. Konstruktion des Plasmids pMUR50	118
5.6. Strategie zur Erzeugung von <i>P. furiosus</i> MURPf12	120
5.7. Strategie zur Erzeugung von <i>P. furiosus</i> MURPf27	121
5.8. Strategie zur Erzeugung von <i>P. furiosus</i> MURPf23.	123
5.9. Strategie zur Erzeugung von <i>P. furiosus</i> MURPf24	124

5.10. Wachstumsverhalten von <i>P. furiosus</i> Wildtyp, MURPf27, MURPf23 und MURPf24 . .	126
5.11. ATP- und Acetat-Gehalt	127

Tabellenverzeichnis

1.1. Überblick der etablierten Selektionsstrategien bei Archaeen	3
1.2. Genetische Werkzeuge für <i>Thermococcales</i>	9
2.1. Ausbeute der Reinigung der RpoA"-RNAPs	36
3.1. Transkriptionsregulatoren der <i>Thermococcales</i>	55
3.2. Verbreitung von Proteinen der TrmB-Familie innerhalb der <i>Thermococcales</i>	58
3.3. Liste der bei qPCRs verwendeten Oligonukleotide	68
3.4. Ergebnis der Genexpressionsanalysen von <i>P. furiosus</i> Wildtyp und Δ TrmBL2	74
3.5. Häufigkeit der chromosomalen TrmBL2-Bindestellen bei <i>P. furiosus</i>	77
4.1. Generationszeit und maximale Zellzahlen von MURPf38 und MURPf39	100

Publikationen

Das hier präsentierte Projekt zur chimären Rpb5/RpoH-Untereinheit entstand in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biochemie II der Universität Regensburg. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner sowie dessen Mitarbeiter Bettina Sommer [Sommer, 2009] und Tobias Seitz [Seitz, 2009].

Teilergebnisse der hier präsentierten Arbeit sind Bestandteil meiner Diplomarbeit bzw. separater Projekte betreuter Studenten und sind daher in den Schriftwerken von Stefan Dext [Dext, 2010], David Pöllmann [Pöllmann, 2010], Martina Knörnschild [Knörnschild, 2011], Karolin Schmutzler [Schmutzler, 2011], Sven Vogel [Vogel, 2011], Martina Kreuzer [Kreuzer, 2011], Dominik Strobel [Strobel, 2012] und Matthias Hupfer [Hupfer, 2012] veröffentlicht.

Ferner wurden einzelne Teilergebnisse publiziert:

Ingrid Waage, Georg Schmid, Sybille Thumann, Michael Thomm und Winfried Hausner (2010). Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Applied and environmental microbiology*, 76, 10, 3308-13).

Martina Kreuzer, Karolin Schmutzler, Ingrid Waage, Michael Thomm und Winfried Hausner (2013). Genetic engineering of *Pyrococcus furiosus* to use chitin as a carbon source. *BMC Biotechnology*, <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/13/9>

Folgende Publikation wurde eingereicht und zur Veröffentlichung angenommen:

Bettina Sommer, Ingrid Waage, David Pöllmann, Tobias Seitz, Michael Thomm, Reinhard Sterner und Winfried Hausner. Activation of a chimeric Rpb5/RpoH subunit using library selection. *PLOS ONE*.

Erklärung der Selbstständigkeit

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Regensburg, im Januar 2014

Danksagung

Nach Abschluss meiner Dissertation möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Michael Thomm möchte ich für die freundliche Überlassung der interessanten Themen und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich danken. Darüber hinaus danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner vom Lehrstuhl für Biochemie II der Universität Regensburg sowie dessen Mitarbeiter Bettina Sommer und Tobias Seitz danke ich sehr für die erfolgreiche Kooperation und die Begutachtung meiner Arbeit.

Mein Dank für die Betreuung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. Winfried Hausner. Seine sachkundigen Hinweise und Anregungen sowie kritischen Kommentare haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders bedanken will ich mich auch für den Freiraum, der mir bei der Planung und Durchführung der Projekte gewährt wurde.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter sowie Studenten des Lehrstuhls für Mikrobiologie für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken will. Im besonderen möchte ich mich bei Elisabeth Nagelfeld für die administrative und auch moralische Unterstützung bedanken.

Schließlich geht ein herzlicher Dank geht Robert Reichelt und Simone Wurm, Mirijam Zeller und Thomas Fouqueau, Antonia Gindner, Michael Loscar, Miguel Lopez und Stefan Dextl, den besten Kollegen und Freunden, die mir jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung gewährt haben. Vielen Dank für die vermittelten Impulse und anregenden Diskussionen, für die kameradschaftliche Zusammenarbeit und zuletzt auch für manch gesellige Runde.

Literaturverzeichnis

- [Aagaard *et al.*, 1996] Aagaard, C., Leviev, I., Aravalli, R. N., Forterre, P., Prieur, D., and Garrett, R. A. (1996). General vectors for archaeal hyperthermophiles: Strategies based on a mobile intron and a plasmid. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3):93–104.
- [Albers und Driessen, 2008] Albers, S.-V. und Driessen, A. J. M. (2008). Conditions for gene disruption by homologous recombination of exogenous DNA into the *Sulfolobus solfataricus* genome. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 2(3):145–9.
- [Albers *et al.*, 2006] Albers, S.-V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampé, R., Driessen, A. J. M., and Schleper, C. (2006). Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Applied and environmental microbiology*, 72(1):102–11.
- [Allers *et al.*, 2010] Allers, T., Barak, S., Liddell, S., Wardell, K., and Mevarech, M. (2010). Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Applied and environmental microbiology*, 76(6):1759–69.
- [Allers und Mevarech, 2005] Allers, T. und Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nature reviews. Genetics*, 6(1):58–73.
- [Allers *et al.*, 2004] Allers, T., Ngo, H.-P., Mevarech, M., and Lloyd, R. G. (2004). Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* Based on the *leuB* and *trpA* Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2):943–953.
- [Amend und Shock, 2001] Amend, J. P. und Shock, E. L. (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 25(2):175–243.
- [Andronopoulou und Vorgias, 2003] Andronopoulou, E. und Vorgias, C. E. (2003). Purification and characterization of a new hyperthermostable, allosamidin-insensitive and denaturation-resistant chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 7(1):43–53.
- [Andronopoulou und Vorgias, 2004] Andronopoulou, E. und Vorgias, C. E. (2004). Multiple components and induction mechanism of the chitinolytic system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6):694–702.
- [Aravalli und Garrett, 1997] Aravalli, R. N. und Garrett, R. A. (1997). Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea. *Extremophiles*, 1(4):183–192.
- [Aravind und Koonin, 1999] Aravind, L. und Koonin, E. V. (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic acids research*, 27(23):4658–70.
- [Argyle *et al.*, 1996] Argyle, J. L., Tumbula, D. L., and Leigh, J. A. (1996). Neomycin resistance as a selectable marker in *Methanococcus maripaludis*. *Applied and environmental microbiology*, 62(11):4233–7.
- [Armache *et al.*, 2005] Armache, K.-J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2005). The dynamic machinery of mRNA elongation. *Current opinion in structural biology*, 15(2):197–203.
- [Atomi, 2005] Atomi, H. (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 9(2):166–73.
- [Atomi *et al.*, 2012] Atomi, H., Imanaka, T., and Fukui, T. (2012). Overview of the genetic tools in the Archaea. *Frontiers in microbiology*, 3:337.
- [Aucelli *et al.*, 2006] Aucelli, T., Contursi, P., Gurfoglio, M., Rossi, M., and Cannio, R. (2006). A spreadable, non-integrative and high copy number shuttle vector for *Sulfolobus solfataricus* based on the genetic element *pssvx* from *Sulfolobus islandicus*. *Nucleic acids research*, 34(17):e114–e114.
- [Ausubel, 1987] Ausubel, F. M. (1987). *Current protocols in molecular biology*. J. Wiley.
- [Bar-Nahum *et al.*, 2005] Bar-Nahum, G., Epshtein, V., Ruckenstein, A. E., Rafikov, R., Mustaev, A., and Nudler, E. (2005). A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. *Cell*, 120(2):183–93.
- [Bartlett, 2005] Bartlett, M. S. (2005). Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase. *Current opinion in microbiology*, 8(6):677–84.

- [Bartlett *et al.*, 2004] Bartlett, M. S., Thomm, M., and Geiduschek, E. P. (2004). Topography of the euryarchaeal transcription initiation complex. *The Journal of biological chemistry*, 279(7):5894–903.
- [Basen *et al.*, 2012] Basen, M., Sun, J., and Adams, M. W. W. (2012). Engineering a hyperthermophilic archaeon for temperature-dependent product formation. *mBio*, 3(2):e00053–12.
- [Bauer *et al.*, 1999] Bauer, M. W., Driskill, L. E., Callen, W., Snead, M. A., Mathur, E. J., and Kelly, R. M. (1999). An endoglucanase, EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes beta-1,4 bonds in mixed-linkage (1→3),(1→4)-beta-D-glucans and cellulose. *Journal of bacteriology*, 181(1):284–90.
- [Baum *et al.*, 2003] Baum, M., Bielau, S., Rittner, N., Schmid, K., Eggelbusch, K., Dahms, M., Schlauersbach, A., Tahedl, H., Beier, M., Güimil, R., Scheffler, M., Hermann, C., Funk, J.-M., Wixmerten, A., Rebscher, H., Hönig, M., Andreae, C., Büchner, D., Moschel, E., Glathe, A., Jäger, E., Thom, M., Greil, A., Bestvater, F., Obermeier, F., Burgmaier, J., Thome, K., Weichert, S., Hein, S., Binnewies, T., Foitzik, V., Müller, M., Stähler, C. F., and Stähler, P. F. (2003). Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucleic acids research*, 31(23):e151.
- [Bell, 2005] Bell, S. D. (2005). Archaeal transcriptional regulation—variation on a bacterial theme? *Trends in microbiology*, 13(6):262–5.
- [Bell und Jackson, 1998] Bell, S. D. and Jackson, S. P. (1998). Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in microbiology*, 6(6):222–8.
- [Bell und Jackson, 2001] Bell, S. D. and Jackson, S. P. (2001). Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Current opinion in microbiology*, 4(2):208–13.
- [Bell *et al.*, 1999] Bell, S. D., Kosa, P. L., Sigler, P. B., and Jackson, S. P. (1999). Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24):13662–7.
- [Bentley, 2005] Bentley, D. L. (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Current opinion in cell biology*, 17(3):251–6.
- [Berkner und Lipps, 2008] Berkner, S. and Lipps, G. (2008). Genetic tools for *Sulfolobus* spp.: vectors and first applications. *Archives of microbiology*, 190(3):217–30.
- [Bertani und Baresi, 1987] Bertani, G. and Baresi, L. (1987). Genetic transformation in the methanogen *Methanococcus voltae* PS. *J. Bacteriol.*, 169(6):2730–2738.
- [Bitan-Banin *et al.*, 2003] Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., and Mevarech, M. (2003). Development of a Gene Knockout System for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* by Use of the *pyrE* Gene. *Journal of Bacteriology*, 185(3):772–778.
- [Blaseio, 1990] Blaseio, U. (1990). Transformation of *Halobacterium halobium*: Development of Vectors and Investigation of Gas Vesicle Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17):6772–6776.
- [Blum *et al.*, 1987] Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, rna and dna in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2):93–99.
- [Blumentals *et al.*, 1990] Blumentals, I. I., Brown, S. H., Schicho, R. N., Skaja, A. K., Costantino, H. R., and Kelly, R. M. (1990). The Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 589(1 Biochemical E):301–314.
- [Boeke *et al.*, 1987] Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R. (1987). [10] 5-fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in enzymology*, 154:164–175.
- [Böhm und Boos, 2004] Böhm, A. and Boos, W. (2004). Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Current opinion in microbiology*, 7(2):151–6.
- [Bouffartigues *et al.*, 2007] Bouffartigues, E., Buckle, M., Badaut, C., Travers, A., and Rimsky, S. (2007). H-nucleosomes cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nature structural & molecular biology*, 14(5):441–448.
- [Bridger *et al.*, 2012] Bridger, S. L., Lancaster, W. A., Poole, F. L., Schut, G. J., and Adams, M. W. W. (2012). Genome sequencing of a genetically tractable *Pyrococcus furiosus* strain reveals a highly dynamic genome. *Journal of bacteriology*, 194(15):4097–106.
- [Brinkman *et al.*, 2000] Brinkman, A. B., Dahlke, I., Tuininga, J. E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J. H., Thomm, M., de Vos, W. M., and van Der Oost, J. (2000). An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *The Journal of biological chemistry*, 275(49):38160–9.
- [Brown *et al.*, 1990] Brown, S. H., Costantino, H. R., and Kelly, R. M. (1990). Characterization of Amylolytic Enzyme Activities Associated with the Hyperthermophilic Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Applied and environmental microbiology*, 56(7):1985–91.

- [Brueckner und Cramer, 2008] Brueckner, F. and Cramer, P. (2008). Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation. *Nature structural & molecular biology*, 15(8):811–8.
- [Brueckner *et al.*, 2009] Brueckner, F., Ortiz, J., and Cramer, P. (2009). A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle. *Current opinion in structural biology*, 19(3):294–9.
- [Buan *et al.*, 2011] Buan, N., Kulkarni, G., and Metcalf, W. (2011). Genetic methods for methanosarcina species. *Methods in enzymology*, 494:23–42.
- [Buhler *et al.*, 1974] Buhler, J. M., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1974). Isolation, structure, and general properties of yeast ribonucleic acid polymerase A (or I). *The Journal of biological chemistry*, 249(18):5963–70.
- [Butler und Kadonaga, 2002] Butler, J. E. F. and Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & development*, 16(20):2583–92.
- [Cannio *et al.*, 1998] Cannio, R., Contursi, P., Rossi, M., and Bartolucci, S. (1998). An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of bacteriology*, 180(12):3237–40.
- [Carter und Drouin, 2010] Carter, R. and Drouin, G. (2010). The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA polymerase III relative to RNA polymerase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors. *Molecular biology and evolution*, 27(5):1035–43.
- [Chandrayan *et al.*, 2012] Chandrayan, S. K., McTernan, P. M., Hopkins, R. C., Sun, J., Jenney, F. E., and Adams, M. W. W. (2012). Engineering hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* to overproduce its cytoplasmic [NiFe]-hydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 287(5):3257–64.
- [Charbonnier *et al.*, 1992] Charbonnier, F., Erauso, G., Barbeyron, T., Prieur, D., and Forterre, P. (1992). Evidence that a plasmid from a hyperthermophilic archaeobacterium is relaxed at physiological temperatures. *Journal of bacteriology*, 174(19):6103–8.
- [Charlebois, 1987] Charlebois, R. L. (1987). Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and Its Use in Demonstrating Trans-formation of an Archaeobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23):8530–8534.
- [Clay *et al.*, 2003] Clay, M. D., Cospers, C. A., Jenney, F. E., Adams, M. W. W., and Johnson, M. K. (2003). Nitric oxide binding at the mononuclear active site of reduced *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7):3796–801.
- [Cline und Doolittle, 1987] Cline, S. W. and Doolittle, W. F. (1987). Efficient transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *Journal of bacteriology*, 169(3):1341–4.
- [Cobucci-Ponzano und Moracci, 2012] Cobucci-Ponzano, B. and Moracci, M. (2012). Glycosynthases as tools for the production of glycan analogs of natural products. *Natural product reports*, 29(6):697–709.
- [Cobucci-Ponzano *et al.*, 2012] Cobucci-Ponzano, B., Perugini, G., Strazzulli, A., Rossi, M., and Moracci, M. (2012). Thermophilic glycosynthases for oligosaccharides synthesis. *Methods in enzymology*, 510:273–300.
- [Cramer *et al.*, 2008] Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G. E., Dengl, S., Geiger, S. R., Jasiak, A. J., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C.-D., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, J. F., and Vannini, A. (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annual review of biophysics*, 37:337–52.
- [Cramer *et al.*, 2001] Cramer, P., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5523):1863–76.
- [Čuboňová *et al.*, 2013] Čuboňová, L., Richardson, T., Burkhart, B. W., Kelman, Z., Connolly, B. A., Reeve, J. N., and Santangelo, T. J. (2013). Archaeal dna polymerase d but not dna polymerase b is required for genome replication in *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of bacteriology*, 195(10):2322–2328.
- [Dahiya *et al.*, 2006] Dahiya, N., Tewari, R., and Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(6):773–82.
- [Dahlke und Thomm, 2002] Dahlke, I. and Thomm, M. (2002). A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic acids research*, 30(3):701–10.
- [Danner und Soppa, 1996] Danner, S. and Soppa, J. (1996). Characterization of the distal promoter element of halobacteria *in vivo* using saturation mutagenesis and selection. *Molecular Microbiology*, 19(6):1265–1276.
- [Darst, 2001] Darst, S. A. (2001). Bacterial RNA polymerase. *Current opinion in structural biology*, 11(2):155–62.

- [DeLong, 1998] DeLong, E. F. (1998). Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Current opinion in genetics & development*, 8(6):649–54.
- [Deng *et al.*, 2009] Deng, L., Zhu, H., Chen, Z., Liang, Y. X., and She, Q. (2009). Unmarked gene deletion and host-vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 13(4):735–46.
- [Dev *et al.*, 2010] Dev, K., Qiu, H., Dong, J., Zhang, F., Barthlme, D., and Hinnebusch, A. G. (2010). The β /gdc7 subunit of eukaryotic translation initiation factor 2b (eif2b), a guanine nucleotide exchange factor, is crucial for binding eif2 *in vivo*. *Molecular and cellular biology*, 30(21):5218–5233.
- [Dexl, 2010] Dexl, S. (2010). Entwicklung eines Systems zur Erzeugung stabiler *in vivo* RNA-Polymerasen von *Pyrococcus furiosus*. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [DiRuggiero *et al.*, 1997] DiRuggiero, J., Santangelo, N., Nackerdien, Z., Ravel, J., and Robb, F. T. (1997). Repair of extensive ionizing-radiation dna damage at 95 degrees c in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of bacteriology*, 179(14):4643–4645.
- [Driessen und Dame, 2011] Driessen, R. C. and Dame, R. (2011). Nucleoid-associated proteins in crenarchaea. *Biochemical Society Transactions*, 39(1):116.
- [Driskill *et al.*, 1999] Driskill, L. E., Bauer, M. W., and Kelly, R. M. (1999). Synergistic interactions among beta-laminarinase, beta-1,4-glucanase, and beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* during hydrolysis of beta-1,4-, beta-1,3-, and mixed-linked polysaccharides. *Biotechnology and bioengineering*, 66(1):51–60.
- [Edwards *et al.*, 1991] Edwards, A. M., Kane, C. M., Young, R. A., and Kornberg, R. D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter *in vitro*. *The Journal of biological chemistry*, 266(1):71–5.
- [Egorova und Antranikian, 2005] Egorova, K. and Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current opinion in microbiology*, 8(6):649–55.
- [Eisenschink, 2010] Eisenschink, S. (2010). Analyse von DNA-Protein-Wechselwirkungen verschiedener Transkriptionskomponenten mittels Chromatin Immunopräzipitationsexperimenten in *Pyrococcus furiosus*. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Erauso *et al.*, 1996] Erauso, G., Marsin, S., Benbouzid-Rollet, N., Baucher, M. F., Barbeyron, T., Zivanovic, Y., Prieur, D., and Forterre, P. (1996). Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *Journal of bacteriology*, 178(11):3232–7.
- [Facciotti *et al.*, 2007] Facciotti, M. T., Reiss, D. J., Pan, M., Kaur, A., Vuthoori, M., Bonneau, R., Shannon, P., Srivastava, A., Donohoe, S. M., Hood, L. E., and Baliga, N. S. (2007). General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11):4630–5.
- [Farkas *et al.*, 2011] Farkas, J., Chung, D., DeBarry, M., Adams, M. W. W., and Westpheling, J. (2011). Defining components of the chromosomal origin of replication of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* needed for construction of a stable replicating shuttle vector. *Applied and environmental microbiology*, 77(18):6343–9.
- [Farkas *et al.*, 2012] Farkas, J., Stirrett, K., Lipscomb, G. L., Nixon, W., Scott, R. A., Adams, M. W., and Westpheling, J. (2012). Recombinogenic properties of *Pyrococcus furiosus* strain com1 enable rapid selection of targeted mutants. *Applied and environmental microbiology*, 78(13):4669–4676.
- [Ferreira-Cerca *et al.*, 2007] Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2007). Analysis of the *in vivo* assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. *Molecular cell*, 28(3):446–57.
- [Fiala und Stetter, 1986] Fiala, G. and Stetter, K. O. (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C. *Archives of Microbiology*, 145(1):56–61.
- [Forget *et al.*, 1997] Forget, D., Robert, F., Grondin, G., Burton, Z. F., Greenblatt, J., and Coulombe, B. (1997). RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14):7150–5.
- [Fouqueau *et al.*, 2013] Fouqueau, T., Zeller, M. E., Cheung, A. C., Cramer, P., and Thomm, M. (2013). The RNA polymerase trigger loop functions in all three phases of the transcription cycle. *Nucleic acids research*, pages gkt433–.
- [Fujiwara *et al.*, 2008] Fujiwara, S., Aki, R., Yoshida, M., Higashibata, H., Imanaka, T., and Fukuda, W. (2008). Expression profiles and physiological roles of two types of molecular chaperonins from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Applied and environmental microbiology*, 74(23):7306–12.

- [Fukuda *et al.*, 2008] Fukuda, W., Morimoto, N., Imanaka, T., and Fujiwara, S. (2008). Agmatine is essential for the cell growth of *Thermococcus kodakaraensis*. *FEMS microbiology letters*, 287(1):113–20.
- [Funkhouser und Aronson, 2007] Funkhouser, J. D. and Aronson, N. N. (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC evolutionary biology*, 7:96.
- [Gal *et al.*, 1998] Gal, S. W., Choi, J. Y., Kim, C. Y., Cheong, Y. H., Choi, Y. J., Lee, S. Y., Bahk, J. D., and Cho, M. J. (1998). Cloning of the 52-kda chitinase gene from *Serratia marcescens* kctc2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kda enzyme1. *FEMS microbiology letters*, 160(1):151–158.
- [Galas und Schmitz, 1978] Galas, D. J. and Schmitz, A. (1978). DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic acids research*, 5(9):3157–70.
- [Gao *et al.*, 2003] Gao, J., Bauer, M. W., Shockley, K. R., Pysz, M. A., and Kelly, R. M. (2003). Growth of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* on chitin involves two family 18 chitinases. *Applied and environmental microbiology*, 69(6):3119–28.
- [García-Fraga *et al.*, 2013] García-Fraga, B., da Silva, A. F., López-Seijas, J., and Sieiro, C. (2013). Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*.
- [Gaspari *et al.*, 2004] Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Gustafsson, C. M. (2004). The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *The EMBO journal*, 23(23):4606–14.
- [Geiduschek und Ouhammouch, 2005] Geiduschek, E. P. and Ouhammouch, M. (2005). Archaeal transcription and its regulators. *Molecular microbiology*, 56(6):1397–407.
- [Gleave *et al.*, 1995] Gleave, A. P., Taylor, R. K., Morris, B. A., and Greenwood, D. R. (1995). Cloning and sequencing of a gene encoding the 69-kda extracellular chitinase of *Janthinobacterium lividum*. *FEMS microbiology letters*, 131(3):279–288.
- [Gnatt *et al.*, 2001] Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5523):1876–82.
- [Goede *et al.*, 2006] Goede, B., Naji, S., von Kampen, O., Ilg, K., and Thomm, M. (2006). Protein-protein interactions in the archaeal transcriptional machinery: binding studies of isolated RNA polymerase subunits and transcription factors. *The Journal of biological chemistry*, 281(41):30581–92.
- [Gohl *et al.*, 1995] Gohl, H. P., Gröndahl, B., and Thomm, M. (1995). Promoter recognition in archaea is mediated by transcription factors: identification of transcription factor aTFB from *Methanococcus thermolithotrophicus* as archaeal TATA-binding protein. *Nucleic acids research*, 23(19):3837–41.
- [Gooday, 1999] Gooday, G. W. (1999). Aggressive and defensive roles for chitinases. *EXS*, 87:157–69.
- [Grainger *et al.*, 2008] Grainger, D. C., Goldberg, M. D., Lee, D. J., and Busby, S. J. (2008). Selective repression by fis and h-ns at the *Escherichia coli* dps promoter. *Molecular microbiology*, 68(6):1366–1377.
- [Grünberger, 2013] Grünberger, F. (2013). Versuche zur Expression einer bifunktionellen Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase in *Pyrococcus furiosus*. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Grochowski *et al.*, 2006] Grochowski, L. L., Xu, H., and White, R. H. (2006). *Methanocaldococcus jannaschii* uses a modified mevalonate pathway for biosynthesis of isopentenyl diphosphate. *Journal of bacteriology*, 188(9):3192–8.
- [Grohmann *et al.*, 2009] Grohmann, D., Hirtreiter, A., and Werner, F. (2009). Molecular mechanisms of archaeal RNA polymerase. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 1):12–7.
- [Grünberg *et al.*, 2007] Grünberg, S., Bartlett, M. S., Naji, S., and Thomm, M. (2007). Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. *The Journal of biological chemistry*, 282(49):35482–90.
- [Grünberg *et al.*, 2010] Grünberg, S., Reich, C., Zeller, M. E., Bartlett, M. S., and Thomm, M. (2010). Rearrangement of the RNA polymerase subunit H and the lower jaw in archaeal elongation complexes. *Nucleic acids research*, 38(6):1950–63.
- [Guss *et al.*, 2008] Guss, A. M., Rother, M., Zhang, J. K., Kulkarni, G., and Metcalf, W. W. (2008). New methods for tightly regulated gene expression and highly efficient chromosomal integration of cloned genes for *Methanosarcina* species. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 2(3):193–203.
- [Hahn, 2004] Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature structural & molecular biology*, 11(5):394–403.

- [Hale *et al.*, 2009] Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., Terns, R. M., and Terns, M. P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 139(5):945–56.
- [Hamana *et al.*, 2003] Hamana, K., Tanaka, T., Hosoya, R., Niitsu, M., and Itoh, T. (2003). Cellular polyamines of the acidophilic, thermophilic and thermoacidophilic archaeobacteria, *Acidilobus*, *Ferroplasma*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Staphylothermus*, *Thermococcus*, *Thermoplasma* and *Vulcanisaeta*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 49(5):287–293.
- [Hanahan, 1983] Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4):557–580.
- [Hartung und Hopfner, 2009] Hartung, S. and Hopfner, K.-P. (2009). Lessons from structural and biochemical studies on the archaeal exosome. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 1):83–7.
- [Hausner und Thomm, 2001] Hausner, W. and Thomm, M. (2001). Events during initiation of archaeal transcription: open complex formation and DNA-protein interactions. *Journal of bacteriology*, 183(10):3025–31.
- [Hausner *et al.*, 1996] Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C., and Thomm, M. (1996). Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry*, 271(47):30144–8.
- [Hayashi *et al.*, 2005] Hayashi, K., Watanabe, T., Tanaka, A., Furumoto, T., Sato-Tsuchiya, C., Kimura, M., Yokoi, M., Ishihama, A., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. (2005). Studies of *Schizosaccharomyces pombe* TFIIE indicate conformational and functional changes in RNA polymerase II at transcription initiation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 10(3):207–24.
- [Henrissat und Bairoch, 1993] Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal*, 293:781–788.
- [Henrissat und Bairoch, 1996] Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *The Biochemical journal*, 316 (Pt 2):695–6.
- [Hethke *et al.*, 1996] Hethke, C., Geerling, A. C., Hausner, W., de Vos, W. M., and Thomm, M. (1996). A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic acids research*, 24(12):2369–76.
- [Higuchi, 1990] Higuchi, R. (1990). Recombinant pcr. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif, pages 177–183.
- [Hileman und Santangelo, 2012] Hileman, T. H. and Santangelo, T. J. (2012). Genetics Techniques for *Thermococcus kodakarensis*. *Frontiers in microbiology*, 3:195.
- [Hilpert *et al.*, 1981] Hilpert, R., Winter, J., Hammes, W., and Kandler, O. (1981). The sensitivity of archaeobacteria to antibiotics. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene. I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 2(1):20–11.
- [Hirata *et al.*, 2008a] Hirata, A., Kanai, T., Santangelo, T. J., Tajiri, M., Manabe, K., Reeve, J. N., Imanaka, T., and Murakami, K. S. (2008a). Archaeal RNA polymerase subunits E and F are not required for transcription *in vitro*, but a *Thermococcus kodakarensis* mutant lacking subunit F is temperature-sensitive. *Molecular microbiology*, 70(3):623–33.
- [Hirata *et al.*, 2008b] Hirata, A., Klein, B. J., and Murakami, K. S. (2008b). The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature*, 451(7180):851–4.
- [Holmes *et al.*, 1994] Holmes, M., Pfeifer, F., and Dyll-Smith, M. (1994). Improved shuttle vectors for *Haloferax volcanii* including a dual-resistance plasmid. *Gene*, 146(1):117–121.
- [Holmes und Dyll-Smith, 1991] Holmes, M. L. and Dyll-Smith, M. L. (1991). Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria. *Journal of bacteriology*, 173(2):642–8.
- [Holstege *et al.*, 1997] Holstege, F. C., Fiedler, U., and Timmers, H. T. (1997). Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *The EMBO journal*, 16(24):7468–80.
- [Holstege und Timmers, 1997] Holstege, F. C. and Timmers, H. T. (1997). Analysis of open complex formation during RNA polymerase II transcription initiation using heteroduplex templates and potassium permanganate probing. *Methods (San Diego, Calif.)*, 12(3):203–11.
- [Horlacher *et al.*, 1998] Horlacher, R., Xavier, K. B., Santos, H., DiRuggiero, J., Kossmann, M., and Boos, W. (1998). Archaeal binding protein-dependent ABC transporter: molecular and biochemical analysis of the trehalose/maltose transport system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Journal of bacteriology*, 180(3):680–9.
- [Huber *et al.*, 1995] Huber, R., Burggraf, S., Mayer, T., Barns, S. M., Rossnagel, P., and Stetter, K. O. (1995). Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by *in situ* RNA analysis. *Nature*, 376(6535):57–8.

- [Huber *et al.*, 2002] Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., and Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, 18(Suppl 1):S96–S104.
- [Hupfer, 2012] Hupfer, M. (2012). Aufreinigung und Charakterisierung von RpoH-Mutanten von *Pyrococcus furiosus*. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Ikeuchi *et al.*, 2010] Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T., and Suzuki, T. (2010). Agmatine-conjugated cytidine in a trna anticodon is essential for aua decoding in archaea. *Nature chemical biology*, 6(4):277–282.
- [Imanaka *et al.*, 2006] Imanaka, H., Yamatsu, A., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2006). Phosphoenolpyruvate synthase plays an essential role for glycolysis in the modified Embden-Meyerhof pathway in *Thermococcus kodakarensis*. *Molecular microbiology*, 61(4):898–909.
- [Inoue *et al.*, 1990] Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1):23–28.
- [Jonuscheit *et al.*, 2003] Jonuscheit, M., Martusewitsch, E., Stedman, K. M., and Schleper, C. (2003). A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Molecular microbiology*, 48(5):1241–52.
- [Jun *et al.*, 2011] Jun, S.-H., Reichlen, M. J., Tajiri, M., and Murakami, K. S. (2011). Archaeal RNA polymerase and transcription regulation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46(1):27–40.
- [Kanai *et al.*, 2007] Kanai, T., Akerboom, J., Takedomi, S., van de Werken, H. J. G., Blombach, F., van der Oost, J., Murakami, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007). A global transcriptional regulator in *Thermococcus kodakaraensis* controls the expression levels of both glycolytic and gluconeogenic enzyme-encoding genes. *The Journal of biological chemistry*, 282(46):33659–70.
- [Kanai *et al.*, 2010] Kanai, T., Takedomi, S., Fujiwara, S., Atomi, H., and Imanaka, T. (2010). Identification of the Phr-dependent heat shock regulon in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of biochemistry*, 147(3):361–70.
- [Kanamaru und Tanaka, 2004] Kanamaru, K. and Tanaka, K. (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(11):2215–23.
- [Kaplan *et al.*, 2008] Kaplan, C. D., Larsson, K.-M., and Kornberg, R. D. (2008). The RNA polymerase II trigger loop functions in substrate selection and is directly targeted by alpha-amanitin. *Molecular cell*, 30(5):547–56.
- [Keeling und Doolittle, 1995] Keeling, P. J. and Doolittle, W. F. (1995). Archaea: narrowing the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13):5761–4.
- [Keese *et al.*, 2010] Keese, A. M., Schut, G. J., Ouhammouch, M., Adams, M. W. W., and Thomm, M. (2010). Genome-wide identification of targets for the archaeal heat shock regulator phr by cell-free transcription of genomic DNA. *Journal of bacteriology*, 192(5):1292–8.
- [Kelman und White, 2005] Kelman, Z. and White, M. F. (2005). Archaeal DNA replication and repair. *Current opinion in microbiology*, 8(6):669–76.
- [Kettenberger *et al.*, 2006] Kettenberger, H., Eisenführ, A., Brueckner, F., Theis, M., Famulok, M., and Cramer, P. (2006). Structure of an RNA polymerase II-RNA inhibitor complex elucidates transcription regulation by noncoding RNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(1):44–8.
- [Kim *et al.*, 1997] Kim, B. J., Kim, S. Y., Park, B. H., Lyu, M. A., Park, I. K., Bai, G. H., Kim, S. J., Cha, C. Y., and Kook, Y. H. (1997). Mutations in the rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology*, 35(2):492–4.
- [Kim *et al.*, 2010] Kim, Y. J., Lee, H. S., Kim, E. S., Bae, S. S., Lim, J. K., Matsumi, R., Lebedinsky, A. V., Sokolova, T. G., Kozhevnikova, D. A., Cha, S.-S., Kim, S.-J., Kwon, K. K., Imanaka, T., Atomi, H., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Lee, J.-H., and Kang, S. G. (2010). Formate-driven growth coupled with H₂ production. *Nature*, 467(7313):352–5.
- [Kixmüller und Greie, 2012] Kixmüller, D. and Greie, J.-C. (2012). Construction and characterization of a gradually inducible expression vector for *Halobacterium salinarum*, based on the kdp promoter. *Applied and environmental microbiology*, 78(7):2100–5.
- [Klein *et al.*, 2011] Klein, B. J., Bose, D., Baker, K. J., Yusoff, Z. M., Zhang, X., and Murakami, K. S. (2011). RNA polymerase and transcription elongation factor Spt4/5 complex structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2):546–50.
- [Knörschild, 2011] Knörschild, M. (2011). Mutationsanalyse der RNA Polymerase anhand eines genetischen Systems in *Pyrococcus furiosus*. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.

- [Koga und Morii, 2007] Koga, Y. and Morii, H. (2007). Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(1):97–120.
- [Kohler und Metcalf, 2012] Kohler, P. R. and Metcalf, W. W. (2012). Genetic manipulation of *Methanosarcina* spp. *Frontiers in microbiology*, 3.
- [Komissarova und Kashlev, 1997] Komissarova, N. and Kashlev, M. (1997). Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5):1755–60.
- [Koning *et al.*, 2001] Koning, S. M., Elferink, M. G., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (2001). Cellobiose uptake in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is mediated by an inducible, high-affinity ABC transporter. *Journal of bacteriology*, 183(17):4979–84.
- [Koning *et al.*, 2002] Koning, S. M., Konings, W. N., and Driessen, A. J. M. (2002). Biochemical evidence for the presence of two alpha-glucoside ABC-transport systems in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 1(1):19–25.
- [Koonin *et al.*, 2007] Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Elkins, J. G. (2007). Orthologs of the small RPB8 subunit of the eukaryotic RNA polymerases are conserved in hyperthermophilic Crenarchaeota and "Korarchaeota". *Biology direct*, 2:38.
- [Korkhin *et al.*, 2009] Korkhin, Y., Unligil, U. M., Littlefield, O., Nelson, P. J., Stuart, D. I., Sigler, P. B., Bell, S. D., and Abrescia, N. G. A. (2009). Evolution of complex RNA polymerases: the complete archaeal RNA polymerase structure. *PLoS biology*, 7(5):e1000102.
- [Kornberg und Lorch, 1999] Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (1999). Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Current opinion in genetics & development*, 9(2):148–51.
- [Kosa *et al.*, 1997] Kosa, P. F., Ghosh, G., DeDecker, B. S., and Sigler, P. B. (1997). The 2.1-Å crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12):6042–7.
- [Kreuzer, 2011] Kreuzer, M. (2011). Optimierung des Chitinaseabbaus in *Pyrococcus furiosus* durch genetic engineering. *Masterarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Kreuzer *et al.*, 2013] Kreuzer, M., Schmutzler, K., Waegel, I., Thomm, M., and Hausner, W. (2013). Genetic engineering of *Pyrococcus furiosus* to use chitin as a carbon source. *BMC biotechnology*, 13:9.
- [Krug *et al.*, 2013] Krug, M., Lee, S.-J., Boos, W., Diederichs, K., and Welte, W. (2013). The three-dimensional structure of TrmB, a transcriptional regulator of dual function in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in complex with sucrose. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 22(6):800–8.
- [Krug *et al.*, 2006] Krug, M., Lee, S.-J., Diederichs, K., Boos, W., and Welte, W. (2006). Crystal structure of the sugar binding domain of the archaeal transcriptional regulator TrmB. *The Journal of biological chemistry*, 281(16):10976–82.
- [Kurosawa und Grogan, 2005] Kurosawa, N. and Grogan, D. W. (2005). Homologous recombination of exogenous dna with the *Sulfolobus acidocaldarius* genome: properties and uses. *FEMS microbiology letters*, 253(1):141–149.
- [Kusser *et al.*, 2008] Kusser, A. G., Bertero, M. G., Naji, S., Becker, T., Thomm, M., Beckmann, R., and Cramer, P. (2008). Structure of an archaeal RNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 376(2):303–7.
- [Kwapisz *et al.*, 2008] Kwapisz, M., Beckouët, F., and Thuriaux, P. (2008). Early evolution of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Trends in genetics : TIG*, 24(5):211–5.
- [Kyrpides und Ouzounis, 1999] Kyrpides, N. C. and Ouzounis, C. A. (1999). Transcription in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15):8545–50.
- [Laemmli *et al.*, 1970] Laemmli, U. K. *et al.* (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *nature*, 227(5259):680–685.
- [Laksanalamai und Robb, 2004] Laksanalamai, P. and Robb, F. T. (2004). Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 8(1):1–11.
- [Lam und Doolittle, 1992] Lam, W. L. and Doolittle, W. F. (1992). Mevinolin-resistant mutations identify a promoter and the gene for a eukaryote-like 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *J. Biol. Chem.*, 267(9):5829–5834.
- [Landick, 2004] Landick, R. (2004). Active-site dynamics in RNA polymerases. *Cell*, 116(3):351–3.

- [Lane und Darst, 2010] Lane, W. J. and Darst, S. A. (2010). Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: structural analysis. *Journal of molecular biology*, 395(4):686–704.
- [Lange und Hausner, 2004] Lange, U. and Hausner, W. (2004). Transcriptional fidelity and proofreading in Archaea and implications for the mechanism of TFS-induced RNA cleavage. *Molecular microbiology*, 52(4):1133–43.
- [Langelier *et al.*, 2001] Langelier, M. F., Forget, D., Rojas, A., Porlier, Y., Burton, Z. F., and Coulombe, B. (2001). Structural and functional interactions of transcription factor (TF) IIA with TFIIE and TFIIIF in transcription initiation by RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry*, 276(42):38652–7.
- [Langer *et al.*, 1995] Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., and Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13):5768–72.
- [Laubinger *et al.*, 2008] Laubinger, S., Zeller, G., Henz, S. R., Sachsenberg, T., Widmer, C. K., Naouar, N., Vuylsteke, M., Scholkopf, B., Ratsch, G., Weigel, D., *et al.* (2008). At-tax: a whole genome tiling array resource for developmental expression analysis and transcript identification in arabidopsis thaliana. *Genome Biol*, 9(7):R112.
- [Le *et al.*, 2005] Le, T. T. T., Zhang, S., Hayashi, N., Yasukawa, M., Delgermaa, L., and Murakami, S. (2005). Mutational analysis of human rna polymerase ii subunit 5 (rpb5): the residues critical for interactions with tfiif subunit rap30 and hepatitis b virus x protein. *Journal of biochemistry*, 138(3):215–224.
- [Lee *et al.*, 2006] Lee, H.-S., Shockley, K. R., Schut, G. J., Conners, S. B., Montero, C. I., Johnson, M. R., Chou, C.-J., Bridger, S. L., Wigner, N., Brehm, S. D., Jenney, F. E., Comfort, D. A., Kelly, R. M., and Adams, M. W. W. (2006). Transcriptional and biochemical analysis of starch metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of bacteriology*, 188(6):2115–25.
- [Lee *et al.*, 2003] Lee, S.-J., Engelmann, A., Horlacher, R., Qu, Q., Vierke, G., Hebbeln, C., Thomm, M., and Boos, W. (2003). TrmB, a sugar-specific transcriptional regulator of the trehalose/maltose ABC transporter from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *The Journal of biological chemistry*, 278(2):983–90.
- [Lee *et al.*, 2005] Lee, S.-J., Moulakakis, C., Koning, S. M., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2005). TrmB, a sugar sensing regulator of ABC transporter genes in *Pyrococcus furiosus* exhibits dual promoter specificity and is controlled by different inducers. *Molecular microbiology*, 57(6):1797–807.
- [Lee *et al.*, 2008] Lee, S.-J., Surma, M., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2008). The role of TrmB and TrmB-like transcriptional regulators for sugar transport and metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archives of microbiology*, 190(3):247–56.
- [Lee *et al.*, 2007a] Lee, S.-J., Surma, M., Seitz, S., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2007a). Characterization of the TrmB-like protein, PF0124, a TGM-recognizing global transcriptional regulator of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Molecular microbiology*, 65(2):305–18.
- [Lee *et al.*, 2007b] Lee, S.-J., Surma, M., Seitz, S., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2007b). Differential signal transduction via TrmB, a sugar sensing transcriptional repressor of *Pyrococcus furiosus*. *Molecular microbiology*, 64(6):1499–505.
- [Leigh *et al.*, 2011] Leigh, J. A., Albers, S.-V., Atomi, H., and Allers, T. (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, *Thermococcales* and *Sulfolobales*. *FEMS microbiology reviews*, 35(4):577–608.
- [Leonard *et al.*, 2001] Leonard, P. M., Smits, S. H., Sedelnikova, S. E., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., van der Oost, J., Rice, D. W., and Rafferty, J. B. (2001). Crystal structure of the lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *The EMBO journal*, 20(5):990–997.
- [Lie und Leigh, 2002] Lie, T. J. and Leigh, J. A. (2002). Regulatory response of *Methanococcus maripaludis* to alanine, an intermediate nitrogen source. *Journal of bacteriology*, 184(19):5301–6.
- [Lie *et al.*, 2005] Lie, T. J., Wood, G. E., and Leigh, J. A. (2005). Regulation of nif expression in *Methanococcus maripaludis*: roles of the euryarchaeal repressor NrpR, 2-oxoglutarate, and two operators. *The Journal of biological chemistry*, 280(7):5236–41.
- [Lin *et al.*, 1997] Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K., and Murakami, S. (1997). Hepatitis b virus x protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor iib and the rna polymerase ii subunit 5. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11):7132–7139.
- [Lindenthal, 2012] Lindenthal, C. (2012). Untersuchungen zur Arginin-Decarboxylase als Selektionsmarker in *Pyrococcus furiosus*. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Lipscomb *et al.*, 2009] Lipscomb, G. L., Keese, A. M., Cowart, D. M., Schut, G. J., Thomm, M., Adams, M. W. W., and Scott, R. A. (2009). SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Molecular microbiology*, 71(2):332–49.

- [Lipscomb *et al.*, 2011] Lipscomb, G. L., Stirrett, K., Schut, G. J., Yang, F., Jenney, F. E., Scott, R. A., Adams, M. W. W., and Westpheling, J. (2011). Natural competence in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* facilitates genetic manipulation: construction of markerless deletions of genes encoding the two cytoplasmic hydrogenases. *Applied and environmental microbiology*, 77(7):2232–8.
- [Littlechild *et al.*, 2013] Littlechild, J., Novak, H., James, P., and Sayer, C. (2013). Mechanisms of thermal stability adopted by thermophilic proteins and their use in white biotechnology. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, pages 481–507. Springer.
- [Littlechild, 2011] Littlechild, J. A. (2011). Thermophilic archaeal enzymes and applications in biocatalysis. *Biochemical Society transactions*, 39(1):155–8.
- [Littlefield *et al.*, 1999] Littlefield, O., Korkhin, Y., and Sigler, P. B. (1999). The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24):13668–73.
- [Lu *et al.*, 2008] Lu, Q., Han, J., Zhou, L., Coker, J. A., DasSarma, P., DasSarma, S., and Xiang, H. (2008). Dissection of the regulatory mechanism of a heat-shock responsive promoter in Haloarchaea: a new paradigm for general transcription factor directed archaeal gene regulation. *Nucleic acids research*, 36(9):3031–42.
- [Lucas *et al.*, 2002] Lucas, S., Toffin, L., Zivanovic, Y., Charlier, D., Moussard, H., Forterre, P., Prieur, D., and Erauso, G. (2002). Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and environmental microbiology*, 68(11):5528–36.
- [Lundgren und Bernander, 2005] Lundgren, M. and Bernander, R. (2005). Archaeal cell cycle progress. *Current opinion in microbiology*, 8(6):662–668.
- [Maaty *et al.*, 2012] Maaty, W. S., Steffens, J. D., Heinemann, J., Ortmann, A. C., Reeves, B. D., Biswas, S. K., Dratz, E. A., Grieco, P. A., Young, M. J., and Bothner, B. (2012). Global analysis of viral infection in an archaeal model system. *Frontiers in microbiology*, 3.
- [Maruyama *et al.*, 2011] Maruyama, H., Shin, M., Oda, T., Matsumi, R., Ohniwa, R. L., Itoh, T., Shirahige, K., Imanaka, T., Atomi, H., Yoshimura, S. H., and Takeyasu, K. (2011). Histone and TK0471/TrmBL2 form a novel heterogeneous genome architecture in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Molecular biology of the cell*, 22(3):386–98.
- [Matsubara *et al.*, 2011] Matsubara, K., Yokooji, Y., Atomi, H., and Imanaka, T. (2011). Biochemical and genetic characterization of the three metabolic routes in *Thermococcus kodakarensis* linking glyceraldehyde 3-phosphate and 3-phosphoglycerate. *Molecular microbiology*, 81(5):1300–12.
- [Matsumi *et al.*, 2011] Matsumi, R., Atomi, H., Driessen, A. J. M., and van der Oost, J. (2011). Isoprenoid biosynthesis in Archaea—biochemical and evolutionary implications. *Research in microbiology*, 162(1):39–52.
- [Matsumi *et al.*, 2007] Matsumi, R., Manabe, K., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007). Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host-marker system based on antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, 189(7):2683–2691.
- [Matsunaga *et al.*, 2001] Matsunaga, F., Forterre, P., Ishino, Y., and Myllykallio, H. (2001). *In vivo* interactions of archaeal cdc6/orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20):11152–11157.
- [Matsuno *et al.*, 2009] Matsuno, Y., Sugai, A., Higashibata, H., Fukuda, W., Ueda, K., Uda, I., Sato, I., Itoh, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. (2009). Effect of growth temperature and growth phase on the lipid composition of the archaeal membrane from *Thermococcus kodakaraensis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 0:0812271228.
- [Mayanagi *et al.*, 2009] Mayanagi, K., Kiyonari, S., Saito, M., Shirai, T., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2009). Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the DNA ligase-PCNA-DNA complex architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12):4647–52.
- [Menon *et al.*, 2009] Menon, A. L., Poole, F. L., Cvetkovic, A., Trauger, S. A., Kalisiak, E., Scott, J. W., Shanmukh, S., Praissman, J., Jenney, F. E., Wikoff, W. R., Apon, J. V., Siuzdak, G., and Adams, M. W. W. (2009). Novel multiprotein complexes identified in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by non-denaturing fractionation of the native proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 8(4):735–51.
- [Meyer und Lamberts, 1965] Meyer, T. and Lamberts, B. (1965). Use of coomassie brilliant blue r250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects*, 107(1):144–145.
- [Minakhin *et al.*, 2001] Minakhin, L., Nechaev, S., Campbell, E. A., and Severinov, K. (2001). Recombinant *Thermus aquaticus* RNA polymerase, a new tool for structure-based analysis of transcription. *Journal of bacteriology*, 183(1):71–6.

- [Miyao und Woychik, 1998] Miyao, T. and Woychik, N. A. (1998). RNA polymerase subunit RPB5 plays a role in transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26):15281–6.
- [Moore und Leigh, 2005] Moore, B. C. and Leigh, J. A. (2005). Markerless mutagenesis in *Methanococcus maripaludis* demonstrates roles for alanine dehydrogenase, alanine racemase, and alanine permease. *Journal of bacteriology*, 187(3):972–9.
- [Morimoto *et al.*, 2010] Morimoto, N., Fukuda, W., Nakajima, N., Masuda, T., Terui, Y., Kanai, T., Oshima, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. (2010). Dual biosynthesis pathway for longer-chain polyamines in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of bacteriology*, 192(19):4991–5001.
- [Mueller *et al.*, 2009] Mueller, M., Takemasa, R., Schwarz, A., Atomi, H., and Nidetzky, B. (2009). SShort-chain α -1,4-glucan phosphorylase having a truncated N-terminal domain: functional expression and characterization of the enzyme from *Sulfolobus solfataricus*. *Biochimica et biophysica acta*, 1794(11):1709–14.
- [Mullis *et al.*, 1992] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of dna *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*, pages 17–17.
- [Naji, 2007] Naji, S. (2007). Reconstitution of a PolII-like RNA polymerase and contribution of subunit E' and structural elements in the active center to RNA polymerase functions. *Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Naji *et al.*, 2007] Naji, S., Grünberg, S., and Thomm, M. (2007). The RPB7 orthologue E' is required for transcriptional activity of a reconstituted archaeal core enzyme at low temperatures and stimulates open complex formation. *The Journal of biological chemistry*, 282(15):11047–57.
- [Nakamura *et al.*, 2005] Nakamura, T., Ishikawa, K., Hagihara, Y., Oku, T., Nakagawa, A., Inoue, T., Ataka, M., and Uegaki, K. (2005). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a chitin-binding domain of hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 61(Pt 5):476–8.
- [Nakamura *et al.*, 2008] Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K., Ikegami, T., and Uegaki, K. (2008). Tertiary structure and carbohydrate recognition by the chitin-binding domain of a hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*. *Journal of molecular biology*, 381(3):670–80.
- [Nakamura *et al.*, 2006] Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K., and Uegaki, K. (2006). Structure of the catalytic domain of the hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(1):7–11.
- [Nalabothula *et al.*, 2013] Nalabothula, N., Xi, L., Bhattacharyya, S., Widom, J., Wang, J.-P., Reeve, J. N., Santangelo, T. J., and Fonduef-Mittendorf, Y. N. (2013). Archaeal nucleosome positioning *in vivo* and *in vitro* is directed by primary sequence motifs. *BMC genomics*, 14(1):391.
- [Navarro und Thuriaux, 2000] Navarro, F. and Thuriaux, P. (2000). In vivo misreading by tRNA overdose. *RNA (New York, N.Y.)*, 6(1):103–10.
- [Nishida *et al.*, 2009] Nishida, H., Mayanagi, K., Kiyonari, S., Sato, Y., Oyama, T., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2009). Structural determinant for switching between the polymerase and exonuclease modes in the PCNA-replicative DNA polymerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49):20693–8.
- [Ochs *et al.*, 2012] Ochs, S. M., Thumann, S., Richau, R., Weirauch, M. T., Lowe, T. M., Thomm, M., and Hausner, W. (2012). Activation of archaeal transcription mediated by recruitment of transcription factor B. *The Journal of biological chemistry*, 287(22):18863–71.
- [Ohkuma *et al.*, 1995] Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C. K., Horikoshi, M., and Roeder, R. G. (1995). Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE- α . *Molecular and cellular biology*, 15(9):4856–66.
- [Oku und Ishikawa, 2006] Oku, T. and Ishikawa, K. (2006). Analysis of the hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*: activity toward crystalline chitin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(7):1696–701.
- [Orell *et al.*, 2013] Orell, A., Remonsellez, F., Arancibia, R., and Jerez, C. A. (2013). Molecular characterization of copper and cadmium resistance determinants in the biomining thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 2013:289236.
- [Orita *et al.*, 2006] Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T., and Sakai, Y. (2006). The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of bacteriology*, 188(13):4698–704.
- [Orphan *et al.*, 2000] Orphan, V. J., Taylor, L. T., Hafenbradl, D., and Delong, E. F. (2000). Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Applied and environmental microbiology*, 66(2):700–11.

- [Oshima *et al.*, 2011] Oshima, T., Moriya, T., and Terui, Y. (2011). Identification, chemical synthesis, and biological functions of unusual polyamines produced by extreme thermophiles. In *Polyamines*, pages 81–111. Springer.
- [Ouhammouch, 2004] Ouhammouch, M. (2004). Transcriptional regulation in Archaea. *Current opinion in genetics & development*, 14(2):133–8.
- [Ouhammouch *et al.*, 2003] Ouhammouch, M., Dewhurst, R. E., Hausner, W., Thomm, M., and Geiduschek, E. P. (2003). Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9):5097–102.
- [Ouhammouch und Geiduschek, 2005] Ouhammouch, M. and Geiduschek, E. P. (2005). An expanding family of archaeal transcriptional activators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43):15423–15428.
- [Palancade und Bensaude, 2003] Palancade, B. and Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *European journal of biochemistry / FEBS*, 270(19):3859–70.
- [Peck *et al.*, 2000] Peck, R. F., DasSarma, S., and Krebs, M. P. (2000). Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarum* with *ura3* as a counterselectable marker. *Molecular microbiology*, 35(3):667–76.
- [Pfeiffer *et al.*, 1998] Pfeiffer, M., Bingemann, R., and Klein, A. (1998). Fusion of two subunits does not impair the function of a [NiFeSe]-hydrogenase in the archaeon *Methanococcus voltae*. *European Journal of Biochemistry*, 256(2):447–452.
- [Pikaard und Tucker, 2009] Pikaard, C. S. and Tucker, S. (2009). Rna-silencing enzymes pol iv and pol v in maize: more than one flavor? *PLoS genetics*, 5(11):e1000736.
- [Pöllmann, 2010] Pöllmann, D. (2010). Anwendung des genetischen Systems zur Gewinnung von Mutanten der RNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Poole *et al.*, 2005] Poole, F. L., Gerwe, B. A., Hopkins, R. C., Schut, G. J., Weinberg, M. V., Jenney, F. E., and Adams, M. W. W. (2005). Defining genes in the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: implications for all microbial genomes. *Journal of bacteriology*, 187(21):7325–32.
- [Portillo und Gonzalez, 2009] Portillo, M. C. and Gonzalez, J. M. (2009). CRISPR elements in the *Thermococcales*: evidence for associated horizontal gene transfer in *Pyrococcus furiosus*. *Journal of applied genetics*, 50(4):421–30.
- [Prangishvili *et al.*, 1998] Prangishvili, D., Albers, S. V., Holz, I., Arnold, H. P., Stedman, K., Klein, T., Singh, H., Hiort, J., Schweier, A., Kristjansson, J. K., and Zillig, W. (1998). Conjugation in archaea: frequent occurrence of conjugative plasmids in *Sulfolobus*. *Plasmid*, 40(3):190–202.
- [Pritchett *et al.*, 2004] Pritchett, M. A., Zhang, J. K., and Metcalf, W. W. (2004). Development of a Markerless Genetic Exchange Method for *Methanosarcina acetivorans* C2A and Its Use in Construction of New Genetic Tools for Methanogenic Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3):1425–1433.
- [Pühler *et al.*, 1989] Pühler, G., Lottspeich, F., and Zillig, W. (1989). Organization and nucleotide sequence of the genes encoding the large subunits A, B and C of the DNA-dependent RNA polymerase of the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucleic acids research*, 17(12):4517–34.
- [Qureshi *et al.*, 1997] Qureshi, S. A., Bell, S. D., and Jackson, S. P. (1997). Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *The EMBO journal*, 16(10):2927–36.
- [Ream *et al.*, 2009] Ream, T. S., Haag, J. R., Wierzbicki, A. T., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Zhu, J.-K., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Paša-Tolić, L., and Pikaard, C. S. (2009). Subunit compositions of the rna-silencing enzymes pol iv and pol v reveal their origins as specialized forms of rna polymerase ii. *Molecular cell*, 33(2):192–203.
- [Reich, 2010] Reich, C. (2010). Analyse von hybriden eukaryotisch-archaeellen RNA-Polymerasen unter besonderer Berücksichtigung der Untereinheiten Rpb5, RpoH und Rpb12, RpoP. *Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Reichenbach, 1981] Reichenbach, H. (1981). Taxonomy of the gliding bacteria. *Annual review of microbiology*, 35:339–64.
- [Reichlen *et al.*, 2012] Reichlen, M. J., Vepachedu, V. R., Murakami, K. S., and Ferry, J. G. (2012). MreA functions in the global regulation of methanogenic pathways in *Methanosarcina acetivorans*. *mBio*, 3(4):e00189–12.
- [Reuter und Maupin-Furlow, 2004] Reuter, C. J. and Maupin-Furlow, J. A. (2004). Analysis of proteasome-dependent proteolysis in *Haloferax volcanii* cells, using short-lived green fluorescent proteins. *Applied and environmental microbiology*, 70(12):7530–8.
- [Rivetti *et al.*, 2003] Rivetti, C., Codeluppi, S., Dieci, G., and Bustamante, C. (2003). Visualizing RNA extrusion and DNA wrapping in transcription elongation complexes of bacterial and eukaryotic RNA polymerases. *Journal of molecular biology*, 326(5):1413–26.

- [Rowlands *et al.*, 1994] Rowlands, T., Baumann, P., and Jackson, S. P. (1994). The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeobacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5163):1326–9.
- [Sambrook *et al.*, 1989] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *et al.* (1989). *Molecular cloning*, volume 2. Cold spring harbor laboratory press New York.
- [Sambrook *et al.*, 2001] Sambrook, J., Russell, D. W., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)*, volume 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor New York.
- [Sanger *et al.*, 1977] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5463–7.
- [Santangelo *et al.*, 2007] Santangelo, T. J., Cubonová, L., James, C. L., and Reeve, J. N. (2007). TFB1 or TFB2 is sufficient for *Thermococcus kodakaraensis* viability and for basal transcription *in vitro*. *Journal of molecular biology*, 367(2):344–57.
- [Santangelo *et al.*, 2008a] Santangelo, T. J., Cubonová, L., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T., and Reeve, J. N. (2008a). Polarity in archaeal operon transcription in *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of bacteriology*, 190(6):2244–8.
- [Santangelo *et al.*, 2008b] Santangelo, T. J., Cubonová, L., and Reeve, J. N. (2008b). Shuttle vector expression in *Thermococcus kodakaraensis*: contributions of cis elements to protein synthesis in a hyperthermophilic archaeon. *Applied and environmental microbiology*, 74(10):3099–104.
- [Santangelo *et al.*, 2010] Santangelo, T. J., Cubonová, L., and Reeve, J. N. (2010). *Thermococcus kodakaraensis* genetics: TK1827-encoded beta-glycosidase, new positive-selection protocol, and targeted and repetitive deletion technology. *Applied and environmental microbiology*, 76(4):1044–52.
- [Sato und Atomi, 2011] Sato, T. and Atomi, H. (2011). Novel metabolic pathways in Archaea. *Current opinion in microbiology*, 14(3):307–14.
- [Sato *et al.*, 2003] Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2003). Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of bacteriology*, 185(1):210–20.
- [Sato *et al.*, 2005] Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2005). Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Applied and environmental microbiology*, 71(7):3889–99.
- [Sato *et al.*, 2004] Sato, T., Imanaka, H., Rashid, N., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2004). Genetic evidence identifying the true gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase in *Thermococcus kodakaraensis* and other hyperthermophiles. *Journal of bacteriology*, 186(17):5799–807.
- [Say und Fuchs, 2010] Say, R. F. and Fuchs, G. (2010). Fructose 1, 6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme. *Nature*, 464(7291):1077–1081.
- [Schäfer und Schönheit, 1993] Schäfer, T. and Schönheit, P. (1993). Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. *Archives of Microbiology*, 159(4):354–363.
- [Schelert *et al.*, 2003] Schelert, J., Dixit, V., Hoang, V., Simbahan, J., Drozda, M., and Blum, P. (2003). Occurrence and Characterization of Mercury Resistance in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* by Use of Gene Disruption. *Journal of Bacteriology*, 186(2):427–437.
- [Schmid *et al.*, 2009] Schmid, A. K., Reiss, D. J., Pan, M., Koide, T., and Baliga, N. S. (2009). A single transcription factor regulates evolutionarily diverse but functionally linked metabolic pathways in response to nutrient availability. *Molecular systems biology*, 5:282.
- [Schmutzler, 2011] Schmutzler, K. (2011). Genetic Engineering von *P. furiosus* zur Veränderung von Stoffwechselprodukten. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Seitz, 2009] Seitz, T. (2009). Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität verschiedener Proteine durch rationales Design und gelenkte Evolution. *Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie II der Universität Regensburg*.
- [Siebers und Schönheit, 2005] Siebers, B. and Schönheit, P. (2005). Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Current opinion in microbiology*, 8(6):695–705.
- [Smale und Kadonaga, 2003] Smale, S. T. and Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry*, 72:449–79.
- [Sommer, 2009] Sommer, B. (2009). Aktivierung einer chimären RNA-Polymerase Untereinheit durch gerichtete Evolution. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie II der Universität Regensburg*.

- [Soppa, 2011] Soppa, J. (2011). Functional genomic and advanced genetic studies reveal novel insights into the metabolism, regulation, and biology of *haloferax volcanii*. *Archaea*, 2011.
- [Spitalny und Thomm, 2003] Spitalny, P. and Thomm, M. (2003). Analysis of the open region and of DNA-protein contacts of archaeal RNA polymerase transcription complexes during transition from initiation to elongation. *The Journal of biological chemistry*, 278(33):30497–505.
- [Staufenberger *et al.*, 2012] Staufenberger, T., Imhoff, J. F., and Labes, A. (2012). First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii*. *Microbiological research*, 167(5):262–269.
- [Stedman *et al.*, 1999] Stedman, K. M., Schleper, C., Rumpf, E., and Zillig, W. (1999). Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of viral shuttle vectors. *Genetics*, 152(4):1397–405.
- [Stetter, 1999] Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS letters*, 452(1-2):22–5.
- [Strobel, 2012] Strobel, D. (2012). Klonierung, Expression und Funktionsanalyse des putativen Transkriptionsfaktors PF0739 aus *Pyrococcus furiosus*. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Stuer-Lauridsen und Nygaard, 1998] Stuer-Lauridsen, B. and Nygaard, P. (1998). Purine salvage in two halophilic archaea: characterization of salvage pathways and isolation of mutants resistant to purine analogs. *Journal of bacteriology*, 180(3):457–463.
- [Summerer, 2009] Summerer, D. (2009). Enabling technologies of genomic-scale sequence enrichment for targeted high-throughput sequencing. *Genomics*, 94(6):363–368.
- [Sweetser *et al.*, 1987] Sweetser, D., Nonet, M., and Young, R. A. (1987). Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(5):1192–6.
- [Sydow und Cramer, 2009] Sydow, J. F. and Cramer, P. (2009). RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Current opinion in structural biology*, 19(6):732–9.
- [Synstad *et al.*, 2004] Synstad, B., Gaseidnes, S., van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E., and Eijsink, V. G. H. (2004). Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry*, 271(2):253–262.
- [Takemasa *et al.*, 2011] Takemasa, R., Yokooji, Y., Yamatsu, A., Atomi, H., and Imanaka, T. (2011). *Thermococcus kodakarensis* as a host for gene expression and protein secretion. *Applied and environmental microbiology*, 77(7):2392–8.
- [Tanaka *et al.*, 1999] Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi, M., and Imanaka, T. (1999). A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakarensis* KOD1. *Applied and environmental microbiology*, 65(12):5338–44.
- [Tanaka *et al.*, 2004] Tanaka, T., Fukui, T., Fujiwara, S., Atomi, H., and Imanaka, T. (2004). Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and exo-beta-D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *The Journal of biological chemistry*, 279(29):30021–7.
- [Tanaka *et al.*, 2001] Tanaka, T., Fukui, T., and Imanaka, T. (2001). Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *The Journal of biological chemistry*, 276(38):35629–35.
- [Terui *et al.*, 2005] Terui, Y., Ohnuma, M., Hiraga, K., Kawashima, E., and Oshima, T. (2005). Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *thermus thermophilus*. *Biochem. J.*, 388:427–433.
- [Thiru *et al.*, 1999] Thiru, A., Hodach, M., Eloranta, J. J., Kostourou, V., Weinzierl, R. O., and Matthews, S. (1999). RNA polymerase subunit H features a beta-ribbon motif within a novel fold that is present in archaea and eukaryotes. *Journal of molecular biology*, 287(4):753–60.
- [Thomm, 2007] Thomm, M. (2007). Transcription: mechanism and regulation. *Archaea: molecular and cellular biology*, pages 139–157.
- [Thomm und Hausner, 2006] Thomm, M. and Hausner, W. (2006). *Transcriptional mechanisms*. Blackwell Publ.
- [Thomm *et al.*, 2009] Thomm, M., Reich, C., Grünberg, S., and Naji, S. (2009). Mutational studies of archaeal RNA polymerase and analysis of hybrid RNA polymerases. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 1):18–22.
- [Thomm und Wich, 1988] Thomm, M. and Wich, G. (1988). An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 16(1):151–163.
- [Tobwin *et al.*, 1970] Tobwin, H., Staehlin, T., and Gordon, J. (1970). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:4350–4354.

- [Todone *et al.*, 2000] Todone, F., Weinzierl, R. O., Brick, P., and Onesti, S. (2000). Crystal structure of RPB5, a universal eukaryotic RNA polymerase subunit and transcription factor interaction target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12):6306–10.
- [Trauger *et al.*, 2008] Trauger, S. A., Kalisak, E., Kalisiak, J., Morita, H., Weinberg, M. V., Menon, A. L., Poole, F. L., Adams, M. W. W., and Siuzdak, G. (2008). Correlating the transcriptome, proteome, and metabolome in the environmental adaptation of a hyperthermophile. *Journal of proteome research*, 7(3):1027–35.
- [Tsuji *et al.*, 2010] Tsuji, H., Nishimura, S., Inui, T., Kado, Y., Ishikawa, K., Nakamura, T., and Uegaki, K. (2010). Kinetic and crystallographic analyses of the catalytic domain of chitinase from *Pyrococcus furiosus*- the role of conserved residues in the active site. *The FEBS journal*, 277(12):2683–95.
- [Tuininga *et al.*, 1999] Tuininga, J. E., Verhees, C. H., van der Oost, J., Kengen, S. W., Stams, A. J., and de Vos, W. M. (1999). Molecular and biochemical characterization of the ADP-dependent phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of biological chemistry*, 274(30):21023–8.
- [Tumbula *et al.*, 1994] Tumbula, D. L., Makula, R. A., and Whitman, W. B. (1994). Transformation of *Methanococcus maripaludis* and identification of a Pst I-like restriction system. *FEMS Microbiology Letters*, 121(3):314–309.
- [Tuske *et al.*, 2005] Tuske, S., Sarafianos, S. G., Wang, X., Hudson, B., Sineva, E., Mukhopadhyay, J., Birktoft, J. J., Leroy, O., Ismail, S., Clark, A. D., Dharia, C., Napoli, A., Laptenko, O., Lee, J., Borukhov, S., Ebright, R. H., and Arnold, E. (2005). Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straight-bridge-helix active-center conformation. *Cell*, 122(4):541–52.
- [van de Werken *et al.*, 2006] van de Werken, H. J. G., Verhees, C. H., Akerboom, J., de Vos, W. M., and van der Oost, J. (2006). Identification of a glycolytic regulon in the archaea *Pyrococcus* and *Thermococcus*. *FEMS microbiology letters*, 260(1):69–76.
- [Vannini und Cramer, 2012] Vannini, A. and Cramer, P. (2012). Conservation between the rna polymerase i, ii, and iii transcription initiation machineries. *Molecular cell*, 45(4):439–446.
- [Vassilyev *et al.*, 2002] Vassilyev, D. G., Sekine, S.-i., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M. N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, 417(6890):712–9.
- [Vassilyev *et al.*, 2007] Vassilyev, D. G., Vassilyeva, M. N., Perederina, A., Tahirov, T. H., and Artsimovitch, I. (2007). Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*, 448(7150):157–62.
- [Verhees *et al.*, 2003] Verhees, C. H., Kengen, S. W. M., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W. W., De Vos, W. M., and Van Der Oost, J. (2003). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *The Biochemical journal*, 375(Pt 2):231–46.
- [Vierke, 2007] Vierke, G. (2007). Die Hitzeschockantwort oberhalb des Siedepunktes von Wasser: Funktion und Struktur des neuartigen Transkriptionsregulators Phr aus *Pyrococcus furiosus*. *Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Vierke *et al.*, 2003] Vierke, G., Engelmann, A., Hebbeln, C., and Thomm, M. (2003). A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. *The Journal of biological chemistry*, 278(1):18–26.
- [Villafane *et al.*, 2009] Villafane, A. A., Voskoboynik, Y., Cuebas, M., Ruhl, I., and Bini, E. (2009). Response to excess copper in the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* strain 98/2. *Biochemical and biophysical research communications*, 385(1):67–71.
- [Vogel, 2011] Vogel, S. (2011). Konstruktion einer Resistenzkassette zur markerlosen Klonierung in *Pyrococcus furiosus*. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Völlmecke *et al.*, 2012] Völlmecke, C., Drees, S. L., Reimann, J., Albers, S.-V., and Lübben, M. (2012). The ATPases CopA and CopB both contribute to copper resistance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 6):1622–33.
- [Voorhorst *et al.*, 1999] Voorhorst, W. G., Gueguen, Y., Geerling, A. C., Schut, G., Dahlke, I., Thomm, M., van der Oost, J., and de Vos, W. M. (1999). Transcriptional regulation in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: coordinated expression of divergently oriented genes in response to beta-linked glucose polymers. *Journal of bacteriology*, 181(12):3777–83.
- [Vorwerk *et al.*, 2008] Vorwerk, S., Ganter, K., Cheng, Y., Hoheisel, J., Stähler, P. F., and Beier, M. (2008). Microfluidic-based enzymatic on-chip labeling of mirnas. *New biotechnology*, 25(2):142–149.
- [Waage *et al.*, 2010] Waage, I., Schmid, G., Thumann, S., Thomm, M., and Hausner, W. (2010). Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Applied and environmental microbiology*, 76(10):3308–13.
- [Wagner *et al.*, 2009] Wagner, M., Berkner, S., Ajon, M., Driessen, A. J. M., Lipps, G., and Albers, S.-V. (2009). Expanding and understanding the genetic toolbox of the hyperthermophilic genus *Sulfolobus*. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 1):97–101.

- [Wang *et al.*, 2006] Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., and Kornberg, R. D. (2006). Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, 127(5):941–54.
- [Wang *et al.*, 2004] Wang, G., Kennedy, S. P., Fasiludeen, S., Rensing, C., and DasSarma, S. (2004). Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. *Journal of bacteriology*, 186(10):3187–94.
- [Wei *et al.*, 2001] Wei, W., Dorjsuren, D., Lin, Y., Qin, W., Nomura, T., Hayashi, N., and Murakami, S. (2001). Direct interaction between the subunit rap30 of transcription factor iif (tfiif) and rna polymerase subunit 5, which contributes to the association between tfiif and rna polymerase ii. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15):12266–12273.
- [Weidenbach *et al.*, 2008] Weidenbach, K., Glöer, J., Ehlers, C., Sandman, K., Reeve, J. N., and Schmitz, R. A. (2008). Deletion of the archaeal histone in *Methanosarcina mazei* Gö1 results in reduced growth and genomic transcription. *Molecular microbiology*, 67(3):662–71.
- [Weinzierl, 2010] Weinzierl, R. O. J. (2010). The nucleotide addition cycle of RNA polymerase is controlled by two molecular hinges in the Bridge Helix domain. *BMC biology*, 8:134.
- [Welander und Metcalf, 2008] Welander, P. V. and Metcalf, W. W. (2008). Mutagenesis of the C1 oxidation pathway in *Methanosarcina barkeri*: new insights into the Mtr/Mer bypass pathway. *Journal of bacteriology*, 190(6):1928–36.
- [Werner, 2008] Werner, F. (2008). Structural evolution of multisubunit RNA polymerases. *Trends in microbiology*, 16(6):247–50.
- [Werner und Grohmann, 2011] Werner, F. and Grohmann, D. (2011). Evolution of multisubunit rna polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2):85–98.
- [Werner und Weinzierl, 2002] Werner, F. and Weinzierl, R. O. J. (2002). A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Molecular cell*, 10(3):635–46.
- [White, 2011] White, R. J. (2011). Transcription by rna polymerase iii: more complex than we thought. *Nature Reviews Genetics*, 12(7):459–463.
- [Wickham, 2007] Wickham, H. (2007). Reshaping data with the reshape package. *Journal of Statistical Software*, 21(12):1–20.
- [Wilfinger *et al.*, 1997] Wilfinger, W., Mackey, K., and Chomczynski, P. (1997). Effect of ph and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3):474–481.
- [Wind und Reines, 2000] Wind, M. and Reines, D. (2000). Transcription elongation factor SII. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(4):327–36.
- [Wirth *et al.*, 2011] Wirth, J. F., Snyder, J. C., Hochstein, R. A., Ortman, A. C., Willits, D. A., Douglas, T., and Young, M. J. (2011). Development of a genetic system for the archaeal virus Sulfolobus turreted icosahedral virus (STIV). *Virology*, 415(1):6–11.
- [Woese, 1990] Woese, C. R. (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12):4576–4579.
- [Wojtas *et al.*, 2011] Wojtas, M., Peralta, B., Ondiviela, M., Moggi, M., Bell, S. D., and Abrescia, N. G. A. (2011). Archaeal RNA polymerase: the influence of the protruding stalk in crystal packing and preliminary biophysical analysis of the Rpo13 subunit. *Biochemical Society transactions*, 39(1):25–30.
- [Wojtas und Abrescia, 2012] Wojtas, M. N. and Abrescia, N. G. A. (2012). Soaking of DNA into crystals of archaeal RNA polymerase achieved by desalting in droplets. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 68(Pt 9):1134–8.
- [Wojtas und Abrescia, 2013] Wojtas, M. N. and Abrescia, N. G. A. (2013). Archaeal transcription: making up for lost time. *Biochemical Society transactions*, 41(1):356–61.
- [Worrell und Nagle, 1990] Worrell, V. E. and Nagle, D. (1990). Genetic and physiological characterization of the purine salvage pathway in the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *Journal of bacteriology*, 172(6):3328–3334.
- [Woychik *et al.*, 1990] Woychik, N. A., Liao, S. M., Kolodziej, P. A., and Young, R. A. (1990). Subunits shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Genes & development*, 4(3):313–23.
- [Xavier *et al.*, 1996] Xavier, K. B., Martins, L. O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W., and Santos, H. (1996). High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Journal of bacteriology*, 178(16):4773–7.
- [Xie und Reeve, 2004] Xie, Y. and Reeve, J. N. (2004). Transcription by an archaeal RNA polymerase is slowed but not blocked by an archaeal nucleosome. *Journal of bacteriology*, 186(11):3492–8.

- [Yan und Gralla, 1997] Yan, M. and Gralla, J. D. (1997). Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. *The EMBO journal*, 16(24):7457–67.
- [Yudkovsky *et al.*, 2000] Yudkovsky, N., Ranish, J. A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*, 408(6809):225–9.
- [Yuzenkova *et al.*, 2010] Yuzenkova, Y., Bochkareva, A., Tadigotla, V. R., Roghanian, M., Zorov, S., Severinov, K., and Zenkin, N. (2010). Stepwise mechanism for transcription fidelity. *BMC biology*, 8:54.
- [Zaros *et al.*, 2007] Zaros, C., Briand, J.-F., Boulard, Y., Labarre-Mariotte, S., Garcia-Lopez, M. C., Thuriaux, P., and Navarro, F. (2007). Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic acids research*, 35(2):634–47.
- [Zeller, 2011] Zeller, M. (2011). Die Funktion von Transkriptionsfaktor (II) B und Mechanismus der Transkriptionsinitiation. *Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- [Zhang und Whitaker, 2012] Zhang, C. and Whitaker, R. J. (2012). A broadly applicable gene knockout system for the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* based on simvastatin selection. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 6):1513–22.
- [Zhang *et al.*, 1999] Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S. A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98(6):811–24.
- [Zhang *et al.*, 2000] Zhang, J. K., Pritchett, M. A., Lampe, D. J., Robertson, H. M., and Metcalf, W. W. (2000). *In vivo* transposon mutagenesis of the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans* C2A using a modified version of the insect mariner-family transposable element Himar1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17):9665–70.
- [Zillig *et al.*, 1996] Zillig, W., Prangishvili, D., Schleper, C., Elferink, M., Holz, I., Albers, S., Janekovic, D., and Götz, D. (1996). Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic Archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3):225–236.